



PEDRO DINIS
PEREIRA NEVES

PLANOS DE ALIMENTAÇÃO E ADITIVOS
VITAMÍNICOS E MINERAIS PARA AQUACULTURA

Relatório de Estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizado sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada com Agregação, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Eng^a Salomé Santos do Departamento da Qualidade da DIN, SA.

O júri

Presidente:

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador Auxiliar da Universidade de Aveiro

Vogais:

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes
Bolsista de Pós-Doutoramento da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professor Associado C/Agregação da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre apoiaram as minhas decisões neste percurso académico e que muito se esforçaram, indo além do que alguma vez lhes poderia ter pedido, para que pudesse seguir livremente os meus sonhos.

Palavras-chave

Aquacultura, Premix, DIN, Vitamina, Mineral.

Resumo

A aquacultura é a produção animal em maior crescimento atualmente. Sendo o peixe a maior fonte de proteína animal em muitas regiões do mundo é cada vez mais importante procurar otimizar as produções de aquacultura, desde o melhoramento das taxas de conversão de alimento até um minimizar de ocorrência de doenças. Foram desenhadas quatro misturas vitamínicas e minerais, denominadas premix, para quatro espécies distintas de culturas em água marinhas, sendo estas o pregado, robalo, dourada e camarão marinho. Foram também desenhados e criados em paralelo planos alimentares para cada uma das quatro espécies em trabalho. Ainda, foram iniciados no decorrer do estágio testes de produção para o premix desenhado para pregado, tendo cumprido os objetivos propostos, apresentando este um CV de 5,5%. Iniciaram-se trabalhos para a construção de estudo *in vivo* das formulações criadas. Com a criação dos premix vitamínicos e dos planos alimentares cumpriu-se o objetivo da empresa DIN, SA., e do trabalho a ser desenvolvido no âmbito do estágio de mestrado em Biotecnologia da Universidade de Aveiro.

Keywords

Aquaculture, Premix, DIN, Vitamin, Mineral.

Abstract

Aquaculture is currently the higher growing animal production. Being fish the biggest source of animal protein in many regions of the world it becomes increasingly important the search for aquaculture production optimization, from the improvement of food conversion rates up to the minimizing of disease occurrence. Four vitamin and mineral mixtures, called premix, were designed for four different species of seawater cultures, such as turbot, sea bass, sea bream and marine shrimp. Dietary plans were also designed and created in parallel for each of the four target species. Also, production tests for the premix designed for turbot were started during this stage, having fulfilled the proposed objectives, presenting a CV of 5.5%. Work began on the construction of an in vivo study of the formulations created. With the creation of the premix vitamins and food plans, the objective of the company DIN, SA., and of the work to be developed within the scope of the master's degree in Biotechnology of the University of Aveiro was fulfilled.

Índice

Índice.....	I
Índice de Figura.....	II
Índice de Tabelas.....	III
Índice de Abreviaturas.....	IV
Introdução e objetivos	1-1
Capítulo 1.....	1-4
1.1. Apresentação da entidade acolhedora de estágio: DIN – Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA.....	1-4
1.1.1. Fundação e acensão	1-4
1.1.2. DIN no presente.....	1-5
Capítulo 2.....	2-7
2.1. Revisão bibliográfica e desenvolvimento das formulações	2-7
2.1.1. Definição do projeto	2-7
2.2. Perfil e necessidades nutricionais das espécies alvo.....	2-13
2.3. Défices vitamínicos e doenças associadas	2-19
2.3.1. Vitaminas	2-19
2.3.2. Vitamina A	2-20
2.3.3. Vitamina C	2-21
2.3.4. Vitamina D	2-21
2.3.5. Vitamina E.....	2-22
2.3.6. Vitamina K.....	2-22
2.3.7. Vitaminas do Complexo B.....	2-22
2.4. Minerais.....	2-25
Capítulo 3.....	3-28
3. Desenho das formulações.....	3-28
3.1. Excipientes	3-29
3.2. Aditivos	3-31
3.3. Planos alimentares	3-34
3.4. Construção das formulações finais	3-37
Capítulo 4.....	4-41
4. Produção, Controlo de qualidade e Resultados	4-41
4.1. Formulação a testar e linha de produção.....	4-41
4.2. Controlo de Qualidade	4-44
Capítulo 5.....	5-49
5. Discussão.....	5-50
Capítulo 6.....	6-52
6. Conclusão	6-53
Capítulo 7.....	7-54
7. Trabalhos futuros.....	7-54
Referências.....	7-57

I - Índice de Figuras

Figura 1 - Logótipo da empresa DIN, SA.	1-4
Figura 2 - Diagrama de trabalho desenvolvido.	2-8
Figura 3 - Gráfico ilustrativo da diferença na quantidade de peixe produzidos em aquacultura.	2-9
Figura 4 - Produção de aquacultura por tipo de água e regime (2013).....	2-10
Figura 5 - Vários regimes de cultura.	2-11
Figura 6 - Pregado (<i>Psetta maxima</i>)..	2-13
Figura 7 - Dourada (<i>Sparus aurata</i>).	2-15
Figura 8 - Robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>).	2-16
Figura 9 - Camarão-patas-brancas (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	2-18
Figura 10 - Salmão com escorbuto.	2-24
Figura 11 - Representação de misturador em "Y".	4-41
Figura 12 - Linha de produção número 2.....	4-42
Figura 13 - Silos de armazenagem de excipientes.....	4-43
Figura 14 - Representação da fórmula de cálculo do coeficiente de variação de Pearson.	4-45
Figura 15 - Processo de ensaque.....	4-46
Figura 16 – Exemplo de etiqueta de produto para o caso do pregado.	4-47
Figura 17 - Resultado do teste de homogeneidade.	4-49

II - Índice de Tabelas

Tabela 1 - Categoria dos minerais essenciais com base na função fisiológica.....	25
Tabela 2 - Composição de Concentrado Vitamínico 5.....	27
Tabela 3 - Estabilidade das vitaminas.	31
Tabela 4 - Necessidades nutricionais camarão marinho.	35
Tabela 5 - Tabela de formulação desenhado para pregado.....	39

Índice de Abreviaturas

APCER	- Associação Portuguesa de Certificação
BHT	- Hidroxitolueno butilado
BW	- Body Weight
CCPA	- Conseils et Compétences en Productions Animales
Cvit	- Concentrado vitamínico
DIN	- Desenvolvimento e Inovação Nutricional
EQ	- Etoxiquina
ESTM	- Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar
FAO	- Food and Agricultural Organization of the United Nations
FCR	- Food Conversion Rate
HACCP	- Hazard Analysis and Critical Control Points
INE	- Instituto Nacional de Estatística
IPL	- Instituto Politécnico de Leiria
IPQ	- Instituto Português da Qualidade
MIF	- Manuel Inácio & Filhos
Mton	- Milhão de tonelada
°C	- Grau Celsius
ton	- Tonelada

Introdução e objetivos

A aquacultura é a produção animal em maior crescimento atualmente a nível mundial estando a tornar-se na maior fonte de alimento animal aquático para consumo humano (Ottinger *et al.*, 2016). O peixe é um dos alimentos atualmente mais comercializado a nível mundial (Allison, 2011) e a maior fonte de proteína animal em muitas regiões do planeta, fornecendo a mais de 4.5 mil milhões de pessoas pelo menos 15% do seu consumo médio de proteína animal per capita (Béné *et al.*, 2015; Toufique & Belton, 2014) e ainda cerca de 6.5% da proteína total consumida (FAO, 2014). Estes dados são importantes ferramentas que permitem perceber a importância do consumo de peixe pelas populações, bem como a importância do papel da aquacultura na alimentação da população no futuro, já que projeções apontam que em 2100 a população mundial irá aumentar dos cerca de 7.2 mil milhões atuais para números entre 9.6 e 12.3 mil milhões (Gerland, 2014) enfatizando assim a importância de peixe produzido em aquacultura por forma a suprimir as necessidades proteicas da população, já que, apenas 150g de peixe podem fornecer entre 50-60% das necessidades proteicas diárias para um adulto (FAO, 2014). De facto, a aquacultura é já a indústria alimentar em mais rápido crescimento no mundo desde os últimos 40 anos (Béné *et al.*, 2015).

Atualmente muito do peixe capturado é descartado para o mar mesmo antes de chegar às lotas, (devido a baixa qualidade, danos aparentes, captura de espécies não alvo ou por terem tamanho inferior ao regulamentado) tendo sido estimado que em 2011 dos 173 milhões de toneladas (Mton) de peixe capturado do ecossistema, 7 a 10 Mton foi descartado ainda no mar e 12 Mton foram perdidos já em processos de triagem em terra (Béné *et al.*, 2015), sendo que de todo o peixe capturado, além do descartado e perdido, muito não é usado para alimentação direta da população. Em 2011, estima-se que 23 Mton de peixe – essencialmente pequenos peixes pelágicos como sardinha e anchovas – tiveram como destino consumo humano indireto, destes, 75% (17 Mton) foram reduzidos a rações e óleos para aquacultura e alimentação de outras culturas (FAO, 2012; Shepherd & Jackson, 2013). Em 2010, 73% de toda a ração produzida de peixe foi usada para alimentar aquaculturas de pescado, seguida por culturas de suínos (20%), aves (5%) e outros (2%) (Shepherd & Jackson, 2013). Ainda,

sob condições de cultura intensas, os peixes são sujeitos a aumentos de estresse devido a condições ambientais relacionadas com a qualidade da água e saúde, como parasitas e doenças infecciosas, sendo que todos estes fatores impactam negativamente no bem-estar das culturas com consequentes perdas económicas (Oliva-Teles, 2012). A procura por inovação no setor alimentar na aquacultura é por isso de grande importância, sendo necessário otimizar o crescimento, quer através do melhoramento das taxas de conversão de alimento quer pelo desenvolvimento correto da espécie, mas também minimizar a ocorrência de doenças nas culturas.

Muitos produtores de alimentação para aquacultura estão a investir grandemente em atividades de investigação e desenvolvimento e têm estabelecido as suas próprias instalações de investigação para testar as suas formulações comerciais, determinar os efeitos da composição/especificação dos ingredientes nas rações e a eficiência de alimentação dos animais criados com condições semelhantes às comerciais (Bureau, 2001).

A nutrição adequada é essencial para evitar sinais de deficiência, manter a performance e saúde das culturas (Oliva-Teles, 2012). Muitas vezes fatores como as doenças estão diretamente relacionados com o défice vitamínico e mineral das rações administradas, por exemplo, o défice de ácido ascórbico pode conduzir a escoliose, lordose, erosão de barbatanas, anemia e aumento de mortalidade, entre outros (Webster & Lim, 2002).

Com o crescimento continuado da aquacultura como indústria, mais atenção tem que ser dada ao bem-estar das culturas já que este tem um impacto significativo na resposta ao estresse, saúde e resistência a doenças, com consequências no desenvolvimento sustentável desta indústria (Ashley, 2007).

As vitaminas são substâncias orgânicas essenciais ao crescimento, saúde reprodução e manutenção, sendo que os peixes não conseguem sintetizar vitaminas de todo, ou conseguem apenas sintetizar em quantidades insuficientes para o normal desenvolvimento, crescimento e manutenção, é por isso necessária a sua suplementação (Webster & Lim, 2002). Desde a década de 80 que autores reportaram que a adição de uma pré-mistura vitamínica comumente denominada de premix vitamínico, surte efeitos positivos nas culturas, como o aumento de peso e a redução da taxa de conversão de alimento (FCR – Food Conversion Rate) (Phromkhutong *et al.*, 1987),

observou-se também já desde esta altura que ao retirar algumas vitaminas essenciais, como a tiamina e riboflavina, da dieta as culturas registavam um aumento de peso e eficiência de alimentação deficiente (Pimoljinda & Boonyaratpalin, 1989). Outros autores como Barrows e colaboradores num estudo mais recente mostram também largos incrementos em peso corporal durante um estudo de 15 semanas, onde peixes alimentados com dietas suplementadas com premix vitamínico registam 1700 a 2100% de aumentos no peso corporal quando comparado com o inicial (Barrows *et al.*, 2008).

É também cada vez mais evidente que a fortificação de rações com nutrientes específicos como vitaminas e minerais com níveis acima dos requeridos pode melhorar a condição de saúde e resistência a doenças das culturas (Oliva-Teles, 2012).

Objetivo

Pretende-se recolher informação científica e técnica que permita desenhar planos alimentares e formulações de pré-misturas vitamínicas e minerais especialmente desenvolvidas para espécies alvo de aquacultura nacional e internacional, com vista a criação de um produto final que possa ser comercializado de modo a ser integrado em rações completas para aquacultura, potenciando o crescimento e desenvolvimento correto, e ao mesmo tempo potenciar uma diminuição da ocorrência de doenças nas culturas de pescado.

Capítulo 1

1.1. Apresentação da entidade acolhedora de estágio: DIN – Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA

1.1.1. Fundação e acensão

A 19 de setembro 1988 foi criada a empresa, no Cartório Notarial de Santa Comba Dão, com a designação de A. PRATA Aditivos Alimentares, Lda. O pacto social foi publicado na III Série do Diário da República n.º 9, de 11 de janeiro de 1989. Posteriormente, por alteração do seu pacto social, a “A. PRATA” deu origem a uma Sociedade Anónima com a designação de INVE Aditivos Alimentares, S.A.

Em 1998 a INVE iniciou um processo de implementação de Sistemas da Qualidade que culminou com a acreditação do seu laboratório em 1999, pelo Instituto Português da Qualidade (IPQ), segundo a norma NP EN ISO 45001 e com a Certificação da empresa em 2000, pela APCER, segundo a norma NP EN ISO 9002: 1995.

A empresa esteve, até dezembro de 2000, ligada ao grupo belga INVE Aditivos Alimentares, SA., que dedicava uma significativa parte da sua atividade à Investigação e à nutrição animal.

Em 2001 ocorreu uma alteração na estrutura acionista da INVE Aditivos Alimentares, S.A., passando a empresa a pertencer a acionistas nacionais ligados ao sector da alimentação e produção animal – Grupo MIF (Manuel Inácio & Filhos). Nessa altura, por escritura pública, a 17 de outubro de 2001, foi alterada a designação social para D.I.N. Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA, sendo criado o logo representativo atualmente em vigor exposto na figura 1. Durante esse ano, adaptou-se ainda o Sistema da Qualidade do Laboratório à norma NP EN ISO / IEC 17025:2000, tendo nesse mesmo ano sido reconhecido, pelo IPQ, a transição do referido sistema.



Figura 1 - Logótipo da empresa DIN, SA.

Em 2002 foi também adaptado o Sistema da Qualidade da empresa ao novo referencial normativo, tendo sido também reconhecido no mesmo ano, pela APCER, a sua conformidade com a norma NP EN ISO 9001: 2000.

Em janeiro de 2007 a DIN concluiu a implementação do Sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), de acordo com os requisitos do Codex Alimentarius e na sequência da publicação do Regulamento (CE) Nº 183/2005 de 12 de janeiro.

Em junho de 2007, na sequência da venda do seu Laboratório de Análises Químicas, a DIN iniciou o projeto de implementação de um novo laboratório para investigação, desenvolvimento e controlo da qualidade.

Já no ano de 2011, o Grupo MIF sofre uma alteração na estrutura acionista e a sua denominação passa a ser Grupo Montalva.

No primeiro semestre de 2012, no âmbito do fabrico de alimentos para animais, a DIN concluiu a implementação do Sistema de Gestão da Segurança Alimentar de acordo com os requisitos da Norma NP EN ISO 22000:2005.

Em maio de 2014, o Instituto Português de Acreditação (IPAC) concedeu a Acreditação ao Laboratório de Investigação e Desenvolvimento da DIN, SA.

1.1.2. DIN no presente

Em julho de 2016, a DIN, SA foi adquirida pelo Grupo CCPA (Conseils et Compétences en Productions Animales) cuja sede se situa em Janzé, França. A nutrição e saúde animal constituem a área de excelência do Grupo CCPA, reconhecido no mercado internacional como uma referência de desenvolvimento, investigação e inovação.

O Grupo CCPA integra as empresas Iframix, Nutristar, Deltavit e, em Portugal, a Ibersan.

A atividade da empresa insere-se no sector do fabrico de alimentos para animais (CAE 10911-R3) e desenvolve-se nas suas instalações (unidades fabris e laboratório) localizadas no Parque Industrial da Catraia, freguesia do Couto do Mosteiro, concelho de Santa Comba Dão.

A DIN, SA desenvolve e produz a sua própria gama de pré-misturas, alimentos de iniciação e especialidades para várias espécies animais e mantém uma atividade importante na comercialização de matérias-primas.

A atividade de desenvolvimento de produtos é suportada pelo seu laboratório - L.I.D. Laboratório de Investigação e Desenvolvimento. O L.I.D. presta serviços laboratoriais aos clientes no âmbito do fabrico de alimentos para animais e a entidades externas.

O quadro técnico da DIN, SA presta serviços técnicos e serviços veterinários especializados aos seus clientes.

Capítulo 2

2.1. Revisão bibliográfica e desenvolvimento das formulações

Será apresentada inicialmente uma revisão genérica dos aspetos que estão na base do trabalho no seguimento deste capítulo. Como a recolha de informação bibliográfica era a base do trabalho, neste capítulo é apresentada esta informação que suporta as escolhas realizadas para as formulações aquando da criação das mesmas.

2.1.1. Definição do projeto

A intenção de projeto avançada pela empresa consistia em desenvolver as pré-misturas apenas para espécies atualmente produzidas já em aquacultura em Portugal, havendo, no entanto, a possibilidade de o fazer também para outras, cujo interesse comercial o justificasse. Com base na informação recolhida, decidiu-se que seriam desenvolvidas formulações para robalo (*Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)), pregado (*Psetta maxima* (Linnaeus, 1758)), dourada (*Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)) e camarão marinho da família Panaeidae como o camarão de patas brancas do pacífico (*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)) entre outros dos mais comercializados desta família.

Delineou-se um plano de trabalho apresentado na figura 2 abaixo, onde estão descritas as várias fases do trabalho desenvolvido no decorrer deste estágio curricular, começando pela recolha de informação bibliográfica geral tendo em conta o objetivo do projeto e interesses da empresa acolhedora, seguindo para a escolha das espécies alvo e desenho das formulações entre outros, cujos processos criativos se encontram descritos à frente neste trabalho, bem como para todos os outros passos mencionados no diagrama apresentado na figura 2.

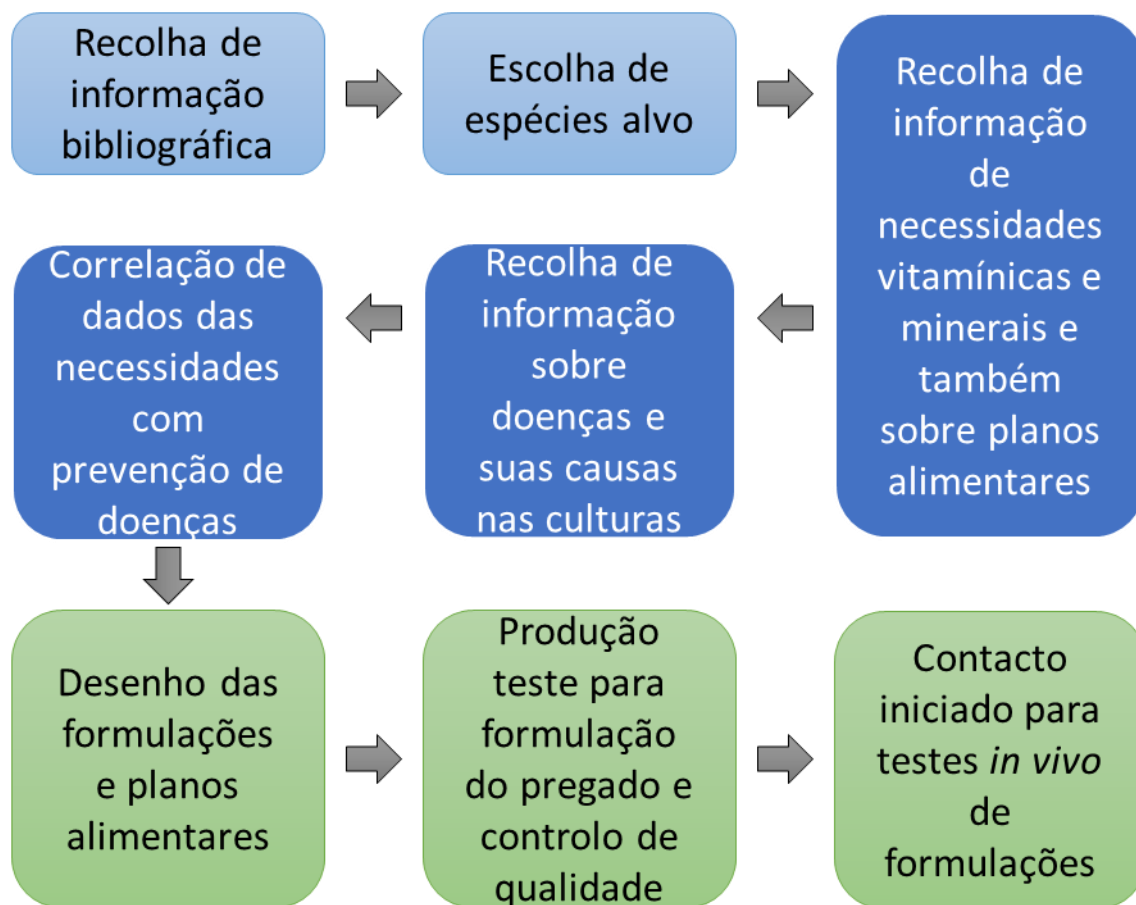


Figura 2 - Diagrama de trabalho desenvolvido. Diagrama representativo das várias fases de trabalho desenvolvidas no decorrer do estágio curricular.

As espécies mencionadas anteriormente neste texto foram escolhidas com base no seu valor de mercado e também por serem produzidas já em Portugal, à exceção do camarão marinho, que não sendo produzido em aquacultura em Portugal está muito presente no mercado português e mundial. Segundo os dados oficiais mais recentes divulgados em 2015 pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) o pregado continua a ser a espécie de peixe mais produzida em aquacultura marinha portuguesa com 2353 toneladas (ton) produzidas, seguido da dourada (1201ton) e robalo (455ton) de um total de 4170ton produzidas (INE, 2015) como pode ser observado numa representação gráfica da figura 3.

Toneladas de peixe produzidas em aquacultura

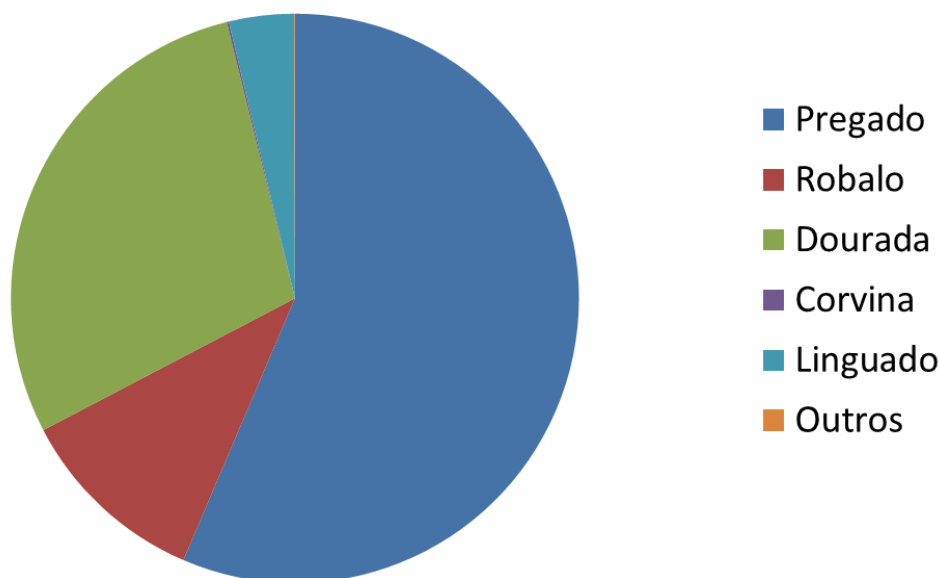


Figura 3 - Gráfico ilustrativo da diferença na quantidade de peixe produzidos em aquacultura. Estão representadas as quantidades, em toneladas, para as espécies mais produzidas em Portugal em aquacultura, referentes ao ano de 2013 (dados mais recentes, publicados no documento oficial do INE: Estatísticas de Pesca 2014.)

A produção total de pescado em águas salobras e marinhas é maioritária, como observado na figura 4, com uma quantidade de produção de 9183 ton no ano de 2013, contabilizando 92% da produção total em aquacultura (INE, 2015). Este foi um fator de peso na escolha das espécies selecionadas para o trabalho, com 4278 hectares (ha) dos 4308 ha existentes em Portugal a corresponderem a produção nestas águas (INE, 2015) optou-se por isso por iniciar o projeto com espécies marinhas.

Registando-se ainda um aumento significativo (+62%) da área total de produção devido ao licenciamento de novos estabelecimentos aquícolas em mar aberto, que apresentam área de ocupação muito alargadas (INE, 2015), estes dados advêm um potencial aumento na produção não tendo este ainda sido contabilizado até então pois após o licenciamento os estabelecimentos apenas começam a produzir cerca de 2 anos depois, podendo vir-se a verificar este aumento de produção já registado nos boletins estatísticos referentes a 2017.

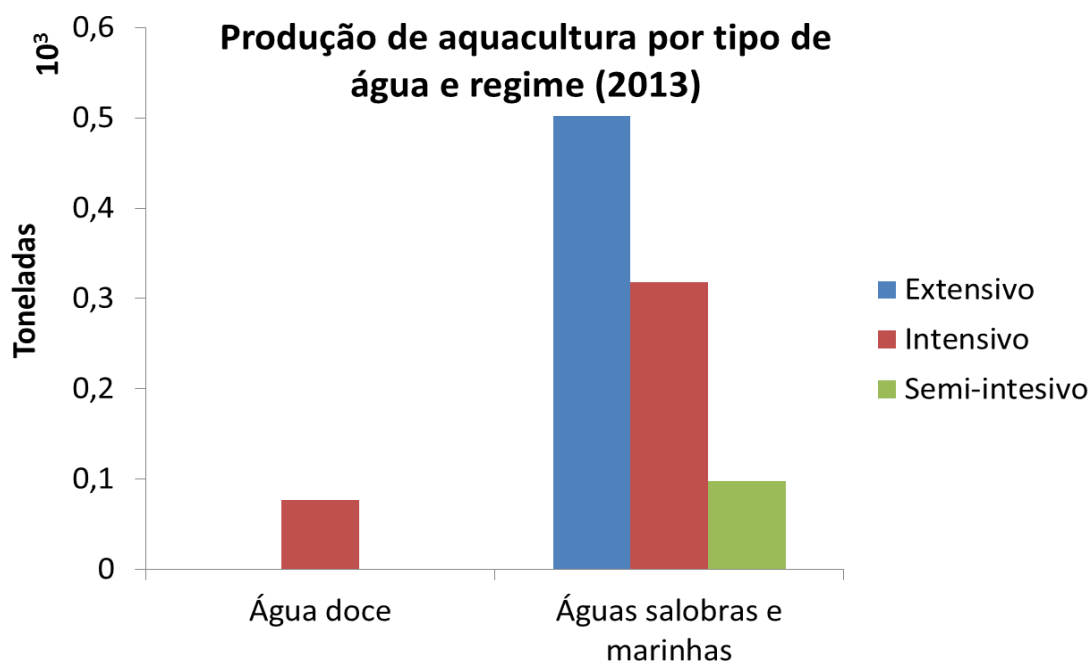


Figura 4 - Produção de aquacultura por tipo de água e regime (2013). Gráfico ilustrativo das quantidades de peixe produzido, em toneladas, em água doce versus águas salobras e marinhas, onde para a água doce o valor de produção total é de 772ton exclusivamente em regime intensivo, e para águas Salobras e marinhas a produção total é de 9183ton, sendo que 5018ton são produzidas em regime extensivo, 3182ton em regime intensivo e 982ton em regime semi-intensivo.

O camarão marinho mais comercializado a nível mundial pertence à família Panaidae, de espécie *Litopenaeus vannamei* mais conhecido por camarão-de-patas-brancas-do-pacífico, representando em conjunto com o camarão tigre preto *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) uma produção de cerca de 80% do total da produção de camarões (Josueit, 2004). Só recentemente começaram a ser divulgados dados sobre recomendações pela parte da FAO no que toca às necessidades nutricionais para *L. vannamei*, podendo estes encontrar-se no documento Latest Facts for Fish and Shrimp Feed Formulations sendo um boletim do Nutrient Requierments Council sobre requerimentos nutricionais para peixe e camarão por John E. Halver, vindo atualizar dados do boletim de 1993 que se encontrava desatualizado. No entanto, mesmo assim apenas informação sobre necessidades nutricionais para piridoxina (vitamina B6), ácido ascórbico (vitamina C), vitamina A e vitamina E podem ser encontrados neste boletim para a espécie *L. vannamei*. Podem, no entanto, ser encontradas já informações sobre as necessidades nutricionais de vitaminas para outras espécies de camarões, o que se torna útil para a construção de formulações funcionais e adequadas. Para *P.*

monodon são já indicados todos os valores quer para todas as vitaminas lipossolúveis quer para as vitaminas hidrossolúveis, estando assim disponível uma base para estudo inicial das necessidades nutricionais para camarão marinho, por correlação desta espécie com as restantes.

A produção extensiva em aquacultura caracteriza-se pelo uso de lagoas naturais ou salina onde os peixes jovens entram nestas lagoas estuarinas naturais com a maré e são aí retidos até atingirem tamanho comercial. Este é o tipo de produção mais tradicionalmente praticado em Portugal, como nas salinas de Aveiro, sendo que são mantidas densidades populacionais baixas e a alimentação é natural (FAO, 2016). Aquando da introdução nestes sistemas de alevins e/ou ração para alimentação, estas produções passam a caracterizar-se por regime semi-intensivo. Já o regime intensivo é caracterizado pelo completo controlo das condições de alimentação, e introdução de alevins, recorrendo a intensidades populacionais muito elevadas, podendo ocorrer em tanques, em terra, ou ainda em jaulas no mar (FAO, 2016).

Apresenta-se a baixo uma figura explicativa (figura 5), dos vários tipos de regime de cultura, onde é demonstrado que não existe um limite claro entre culturas, sendo necessário ter em conta vários fatores para tal.

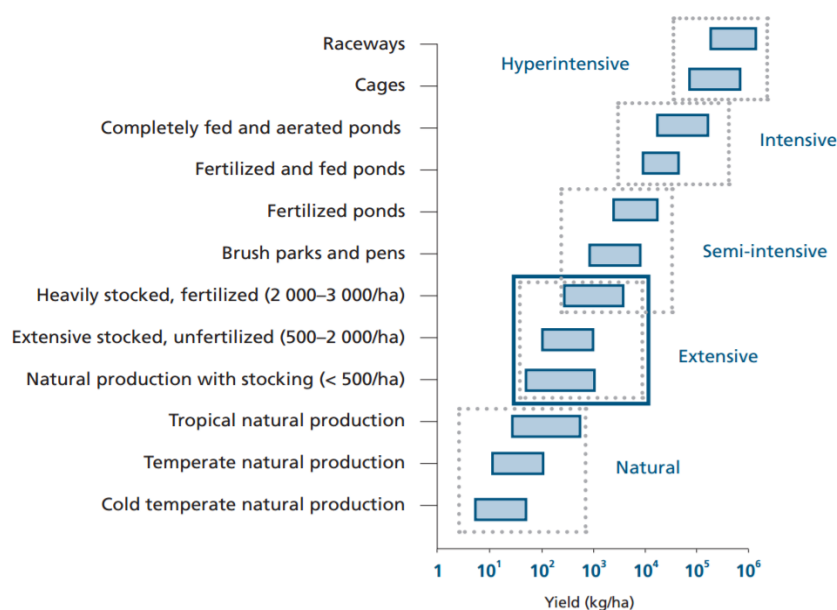


Figura 5 - Vários regimes de cultura. Representação do vários regimes de produção de peixe e suas características. Fonte: Welcomme, R.L. & Bartley, D.M. 1998. An evaluation of present techniques for the enhancement of -sheries. In T. Petr, ed. Inland shery enhancements. FAO Fisheries Technical Paper No. 374. Rome, FAO. 463 pp. (also available at www.fao.org/docrep/005/w8514e/w8514e00.htm).

Cada uma das espécies escolhidas apresenta necessidades nutricionais próprias e diferentes entre elas, foi por isso necessário recolher informação de início sobre quais as vitaminas e minerais que os autores recomendam que sejam incorporadas para cada espécie bem como perceber quais as quantidades a usar. Para isso a FAO apresenta na sua plataforma online uma compilação dos dados mais relevantes no que toca a nutrição em aquacultura para várias espécies, sendo possível encontrar também nestes dados informação compilada de rações e premix vendidas atualmente. Apesar de as necessidades vitamínicas não estarem ainda estudadas e divulgadas para todas as espécies, uma comparação entre espécies filogeneticamente distantes indica que as necessidades vitamínicas são muito semelhantes entre espécies e por isso pode admitir-se a hipótese de que as diferenças nas necessidades vitamínicas, principalmente nas hidrossolúveis são negligenciáveis entre espécies (Oliva-Teles, 2012).

As deficiências vitamínicas, em conjunto com as minerais, são fáceis de evitar nas dietas reais dos peixes, no entanto são a categoria de deficiências mais observadas em aquacultura comercial (Hardy, 2001). Ainda, o processo de formulação de dietas e produção (por exemplo, trituração, aquecimento, adição de humidade, *pelleting* e secagem) adiciona um elemento de incerteza à estabilidade e biodisponibilidade de certos nutrientes essenciais, que muitas vezes resulta em deficiências clínicas de muitos nutrientes (Hardy, 2001), pois além de serem fatores que incutem uma condição de stress nas misturas, são ainda fatores que diferem entre produtores de ração, os quais vão incorporar as pré-misturas produzidas, e que não podem ser controlados, sendo incerto o nível de trituração, temperaturas usadas ou humidade introduzida nos processos de produção.

São conhecidos efeitos nefastos da ausência de vitaminas em quantidades adequadas na alimentação, podendo referenciar-se o estudo de 15 semanas, onde o grupo de peixes alimentado com ração sem inclusão de premix vitamínico e mineral teve que ser terminado apenas às 9 semanas devido a crescimento lento, sinais de deficiência e mortalidade crescente (Barrows *et al.*, 2008). Outros autores apontam ainda que a deficiência de certas vitaminas na dieta leva ao aumento da suscetibilidade para determinadas doenças características nas espécies em cultura.

A par desta informação foi necessário compilar os dados disponíveis sobre as necessidades nutricionais para cada espécie e extrapolar valor das quantidades a usar

para aquelas que não tivessem já publicadas indicações das suas necessidades tendo em conta também as perdas a registar no processo de fabrico, armazenamento e também aquando da inclusão em ração.

2.2. Perfil e necessidades nutricionais das espécies alvo

2.2.1. Pregado – *Psetta maxima*

A aquacultura do pregado, representado na figura 6, começou na década de 1970 na Escócia (Reino Unido) como referido pela FAO, posteriormente, foi introduzido para a França e para a Espanha. No princípio, o número de instalações em Espanha era bastante limitado devido à escassez de juvenis. O desenvolvimento tecnológico da produção de juvenis muda tudo isso, havendo no início da década de 1990, já 16 produtores em Espanha. Uma crise significativa na cultura do pregado ocorreu em 1992; houve um aumento de 52% na produção, mas a indústria não tinha uma rede de marketing comercial consolidada. Outro fator que contribuiu para esta crise foi o facto de as culturas existentes serem pequenas e tinham custos de produção muito elevados. Esta crise provocou o encerramento de algumas culturas. A partir desse momento uma reorganização do sector começou, o que deu origem a um crescimento tanto na produção como no número de países onde o pregado é produzido. Espanha, com as suas condições oceanográficas altamente adequadas, é agora o maior produtor mundial, mas o pregado está também atualmente a ser produzido na Dinamarca, Alemanha, Islândia, Irlanda, Itália, Noruega, País de Gales (Reino Unido), e Portugal. A distribuição natural do pregado inclui as águas costeiras de todos esses países. O pregado também foi introduzido para outras regiões (como o Chile no final de 1980) e, mais recentemente, na China.

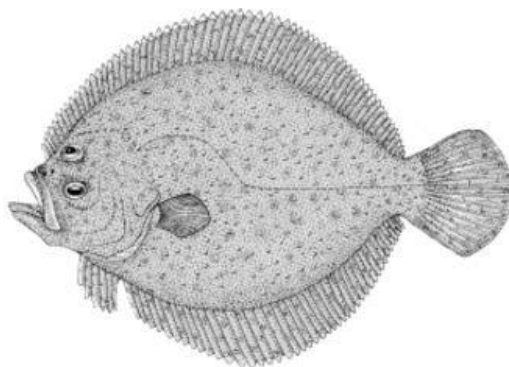


Figura 6 - Pregado (*Psetta maxima*). Desenho representativo do pregado. Fonte: FAO, 2015.

Tabela 1 - Necessidades nutricionais do pregado. Tabela ilustrativa das necessidades nutricionais documentadas. Valores apresentados por quilo de ração completa. Fonte: Tucker, 2012.

Necessidades Nutricionais			
Minerais mg/kg ração			
Zinco	100-1050	Mn	200
Vitaminas, min IU/kg			
Vitamina A	-	Vitamina D	-
Vitaminas, min mg/kg			
Vitamina E	30	Colina	-
Vitamina K	-	Inositol	-
Vitamina B1	0.6-2.6	Biotina	-
Vitamina B2	22	Vitamina C	100
Vitamina B6	2.5		
Ácido Pantoténico	-		
Niacina	-		
Ácido Fólico	-		
Vitamina B12	-		

2.2.2. Dourada – *Sparus aurata*

Tradicionalmente, a dourada (figura 7), foi cultivada extensivamente em lagoas costeiras e lagoas de água salgada, até os sistemas de criação intensiva terem sido desenvolvidos durante a década de 1980 (FAO, 2015). Segundo a FAO o Italiano “vallicoltura” ou o egípcio “hosha” são sistemas de criação extensos de peixe que funcionam como armadilhas para peixes natural, aproveitando a migração trófica natural de juvenis do mar para lagoas costeiras. A dourada é uma espécie muito apropriada para aquacultura extensiva no Mediterrâneo, devido aos seus bons preços de mercado, alta taxa de sobrevivência e hábitos de alimentação (que são relativamente baixos na cadeia alimentar). A reprodução artificial foi conseguida com sucesso em Itália em 1981-82 e a produção em larga escala de juvenis de dourada foi definitivamente alcançada em 1988-1989 em Espanha, Itália e Grécia. A produção de

incubação e da aquacultura deste peixe é uma das histórias de sucesso do negócio da aquacultura. Esta espécie demonstrou muito rapidamente uma alta adaptabilidade às condições de criação intensiva, tanto em viveiros e gaiolas, e a sua produção anual aumentou regularmente até 2000, quando atingiu um pico de mais de 87 000 toneladas.

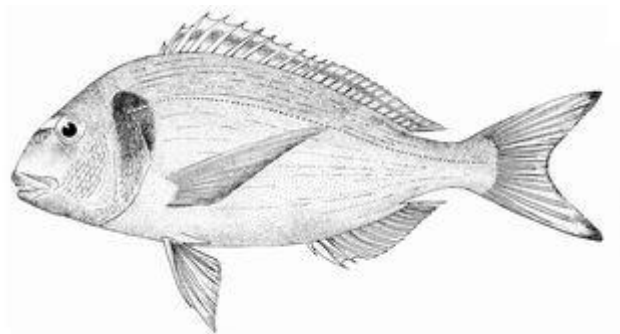


Figura 7 - Dourada (*Sparus aurata*). Desenho representativo da dourada. Fonte: FAO, 2015.

A compilação de dados nutricionais para dourada é apresentada a baixo na tabela 2, onde se podem ver apenas os valores existentes para as várias fases de crescimento.

Tabela 2 - Necessidades nutricionais da dourada. Tabela ilustrativa das necessidades nutricionais documentadas. Valores apresentados por quilo de ração completa. Fonte: FAO, 2016.

Necessidades Nutricionais			
Minerais mg/kg			
Zinco	120	Iodo	4
Crómio	1	Cálcio	6000
Vitaminas, min IU/kg			
Vitamina A	6000	Vitamina D	2500
Vitaminas, min mg/kg			
Vitamina E	200	Colina	2000
Vitamina K	10	Inositol	600
Vitamina B1	20	Biotina	1
Vitamina B2	20	Vitamina C	200
Vitamina B6	5	Niacina	150
Ácido Pantoténico	50	Ácido Fólico	5
Vitamina B12	0.02		

2.2.3. Robalo – *Dicentrarchus labrax*

O robalo, representado na figura 8, segundo a FAO foi historicamente cultivado em lagoas costeiras e reservatórios de maré antes do início da sua produção em massa de alevins que começou na década de 1960. Durante a década de 1960, França e Itália competiram para desenvolver técnicas de produção em massa fiáveis para robalos juvenis e, no final da década de 1970, essas técnicas estavam suficientemente bem desenvolvidas na maioria dos países do Mediterrâneo para fornecer centenas de milhares de larvas. O robalo foi a primeira espécie de não salmonídeos marinhos a ser comercialmente cultivadas na Europa e atualmente é o peixe comercial mais importante amplamente cultivado em zonas mediterrânicas. Grécia, Turquia, Itália, Espanha, Croácia e Egito são os maiores produtores.

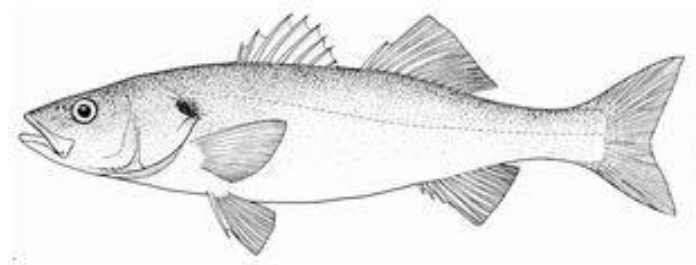


Figura 8 - Robalo (*Dicentrarchus labrax*). Desenho representativo do robalo. Fonte: FAO, 2015.

Tabela 3 - Necessidades nutricionais do robalo. Tabela ilustrativa das necessidades nutricionais documentadas. Valores apresentados por quilo de ração completa. Fonte: FAO, 2016; Tucker, 2012.

Necessidades Nutricionais			
Minerais mg/kg			
Crômio	1	Cálcio	6000
Vitaminas, min IU/kg			
Vitamina A	5000	Vitamina D	1000
Vitaminas, min mg/kg			
Vitamina E	200	Colina	3500
Vitamina K	80	Inositol	900
Vitamina B1	40	Biotina	1
Vitamina B2	40	Vitamina C	2000
Vitamina B6	40		
Ácido Pantoténico	100		
Niacina	150		
Ácido Fólico	5		
Vitamina B12	0.02		

2.2.4. Camarão Marinho – *Litopenaeus vannamei* (Família Penaeidae)

O camarão-de-patas-brancas, representado na figura 9, segundo a descrição da FAO teve a primeira desova em cultura conseguida na Flórida, em 1973, a partir de náuplios nascidos e enviados de uma fêmea acasalada selvagem capturada no Panamá. Na sequência de bons resultados em lagoa e a descoberta de ablação unilateral (indução de maturação gonadal) e nutrição adequadas para promover a maturação no Panamá em 1976, a cultura comercial de *Litopenaeus vannamei* começou no Sul e América Central. O subsequente desenvolvimento de técnicas de reprodução e de criação intensiva levou à sua cultura no Havai, e grande parte da América Central e do Sul no início dos anos 1980. A partir deste momento, a cultura comercial desta espécie na América Latina mostrou uma tendência crescente (com picos a cada 3-4 anos, durante o clima quente e húmido dos anos de “el niño”), pontuada por quedas coincidentes com surtos de doenças durante os frios anos de “la niña”. Apesar destes problemas, a

produção de *L. vannamei* das Américas tem vindo a aumentar - depois de ter descido de seu pico de produção anterior de 193 000 toneladas em 1998 para 143 000 toneladas em 2000 tinha crescido para mais de 270 000 toneladas em 2004. A Ásia tem visto um aumento fenomenal na produção de *L. vannamei*. A produção apurada pela FAO em 1999, foi de cerca de 1 116 000 toneladas até 2004 e tinha ultrapassado a produção de *P. monodon* na China, Taiwan, Província da China e da Tailândia, devido a uma série de fatores favoráveis. A Tailândia e Indonésia permitem livremente a sua cultura comercial, mas têm restrições oficiais no que respeita a importação de reprodutores. Da mesma forma, a maioria dos países latino-americanos têm leis de quarentena estritas ou proibições para impedir a importação de patógenos exóticos com novos reprodutores.

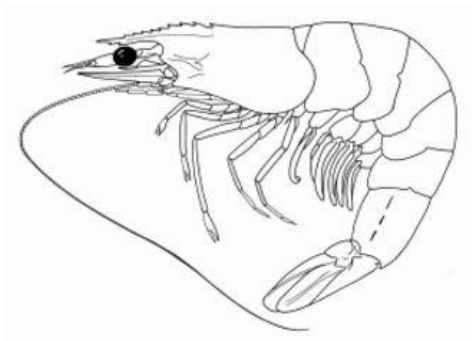


Figura 9 - Camarão-patas-brancas (*Litopenaeus vannamei*). Desenho representativo do camarão-de-patas-brancas, da família Penaeidae á qual pertencem *P. monodon*. Fonte: FAO, 2015.

Tabela 4 - Necessidades nutricionais camarão marinho. Tabela ilustrativa da compilação de necessidades nutricionais documentadas para várias espécies de camarão marinho. Valores apresentados por quilo de ração completa. Fonte: FAO, 2016; Halver, 2002.

Necessidades Nutricionais			
Minerais mg/kg			
Zn	10	Mn	10
Vitaminas, min IU/kg			
Vitamina A	5000	Vitamina D	0.06
Vitaminas, min mg/kg			
Vitamina E	125-300	Colina	160
Vitamina K	5.4	Inositol	160
Vitamina B1	20	Biotina	0.5
Vitamina B2	16	Vitamina C	1000
Vitamina B6	20		
Ácido Pantoténico	40		
Niacina	100		
Ácido Fólico	8		
Vitamina B12	0.04		

2.3. Défices vitamínicos e doenças associadas

2.3.1. Vitaminas

As vitaminas são compostos orgânicos, distintos de aminoácidos, hidratos de carbono e lípidos, que são necessários em quantidades vestigiais de uma fonte exógena (usualmente a dieta) para normal crescimento, reprodução e saúde (N.R.C., 1993).

As vitaminas solúveis em água incluem oito bem reconhecidos membros das vitaminas do complexo B (vitaminas B1, B2, B6, B12, ácido pantoténico, niacina, ácido fólico e biotina), os fatores nutricionais essenciais, colina, inositol e vitamina C, e ainda várias vitaminas com atividades menos definidas para peixes (Halver, 2002).

Das vitaminas solúveis em gordura são exemplo a vitamina A, D, E e K, e cada ocorre em diferentes formas químicas tendo atividade fisiológica, sendo que estas diferem das vitaminas solúveis em água na sua ação cumulativa (Halver, 2002).

Estudos sobre a influência de vitaminas na resposta do sistema imunitário e resistência a doenças, continuam limitados (Lime *et al.*, 2008), sendo que a vitamina solúvel em água, ácido ascórbico (vitamina C), é de longe a vitamina mais estudada em nutrição de peixes (Blazer, 1992).

A filosofia na determinação das necessidades vitamínicas para peixes, ao contrário de outras culturas, tem-se focado historicamente na prevenção de deficiências num espectro alargado de ambientes e espécies (Barrows *et al.*, 2008), no entanto, a natureza de competitividade de preços da aquacultura é agora mais como as outras culturas requerendo um aumento na precisão das formulações de dietas de maneira a minimizar custos de produção mantendo a máxima performance (Barrows *et al.*, 2008).

No documento escrito pelo Subcommittee on Fish Nutrition, do National Research Council, com o título “Nutriente Requirments of Fish” (N.R.C 1993), encontram-se também compiladas várias evidências no que diz respeito às doenças mais comuns em peixes relacionadas com o défice vitamínico na dieta.

2.3.2. Vitamina A

A suplementação de vitamina A é cedo reportada após análise de vários estudos por Blazer em 1992 no seu artigo de *review*, Nutrition and disease resistance, que esta mostrava até então diminuir a suscetibilidade de animais a uma variedade de infeções, e que evidências apontavam para que pelo menos alguma da sua proteção seria devida ao aumento da função celular dos fagócitos.

Koshio, após compilar várias fontes de estudos do efeito de vitaminas na dieta, apresenta as evidências reportadas em várias espécies marinhas, onde níveis de vitamina A entre 150 e 300 mg/kg dieta, em dourada, surtiram efeitos benéficos na rápida libertação de espécies reativas de oxigénio, tendo um papel importante no sistema imunitário (Koshio (2007). É apontado ainda que o défice de vitamina A está relacionado com vários fatores, desde o impedimento do crescimento do opérculo, despigmentação da pele, deslocamento dos olhos, pele e barbatanas hemorrágicas entre outros.

2.3.3. Vitamina C

Já desde a década de 70 que surgem evidências de que a deficiência de vitaminas pode ter um efeito nefasto, como Lovell e Lim reconheceram em 1978 no seu artigo “Vitamin C in pond diets of channel fish”, que o peixe bagre, mantido em lagoas, a médias densidade (98 peixes/100/m²), e alimentado com dietas deficientes em vitamina C, eram mais suscetíveis a infecções por *Aeromonas hydrophilia* (20% de mortalidade) do que aqueles alimentados com dietas suplementadas (5% de mortalidade) (Lovell & Lim, 1978).

Efeitos semelhantes aos observados com adição de vitamina A e E são também evidentes com adição de vitamina C para valores de 3000 mg/kg e de 12000 mg/kg quando testado combinado com vitamina E (Koshio, 2007). Os efeitos positivos da adição de vitamina C na dieta são também apresentados por este autor para o pregado, onde quantidades entre 800 e 1200 mg/kg dieta produzem efeitos a nível da eficiência da fagocitose e da atividade da lisozima (Koshio, 2007).

Acumulou-se já, informação considerável mostrando que a suplementação acima do necessário da dieta com certas vitaminas, particularmente vitaminas C e E, melhoram a tolerância ao estresse, resposta imunológica e resistência a doenças em peixes (Koshio, 2007; Lime *et al.*, 2008).

Doenças no pescado como o desenvolvimento incompleto do opérculo, podem ser originadas pela deficiência de vitamina C em várias espécies. (Tucker, 2012).

Por último é também descrita uma lista de sintomas e doenças associadas ao défice de ácido ascórbico (vitamina C), sendo que estes são semelhantes aos mencionados já em cima e por outros autores como escorbuto (figura 10) escoliose, anemia, lordose, hemorragias nas barbatanas e na derme, crescimento pobre, coloração escura da pele, e mortalidade (Hardy, 2001).

2.3.4. Vitamina D

O défice de vitamina D aparece relacionado com o baixo teor de cinza, potássio e cálcio, tétano do músculo-esquelético e aumento de lípidos no fígado (N.R.C 1993).

2.3.5. Vitamina E

São também apresentadas evidências de efeitos benéficos a nível da fagocitose para adição de vitamina E na ordem das 1200 mg/kg dieta (Koshio, 2007). Já aqui eram também referenciados os efeitos da vitamina E (alfa-tocoferol) no aumento da proliferação, quimiotaxia e atividade bactericida dos fagócitos em dosagens moderadas.

O défice de vitamina E está relacionado com efeitos semelhantes aos do défice de vitamina A, registando-se alguns adicionais como degeneração dos rins e pâncreas, lordose, anemia, edemas, mantos bronquiais, barbatanas congestionadas, coloração escura da pele, e espasmos (N.R.C 1993).

2.3.6. Vitamina K

A deficiência de vitamina K é apontada como relacionada com as branquias e olhos hemorrágicos, coágulos de sangue prolongados e anemia (N.R.C 1993).

2.3.7. Vitaminas do Complexo B

Deficiência de tiamina (vitamina B1) está relacionada com a perda de equilíbrio, hiperirritabilidade, convulsões, hemorragias subcutâneas, distúrbios nervosos, entre outros também comuns aos efeitos de outras vitaminas. Os peixes com deficiência de tiamina estão sujeitos ao que parecem ser convulsões quando são espantados por um impacto subido na superfície da água ou uma pancada nos lados dos tanques (Hardy, 2001). Deficiência de riboflavina (vitamina B2) está associada a deficiências de crescimento, deformidade espinal, erosão de barbatanas, vascularização da córnea, dermatite, hemorragia abdominal, necrose anterior do rim entre outros. O défice de niacina (vitamina B3) está associado a várias lesões, da barbatana, pele e cólon, destacando-se também a relação com incrementos de mortalidade, deformidades, fotossensibilidade, e crescimento pobre. Peixes com défice de Niacina registam também espasmos musculares quando em descanso (Hardy, 2001). O ácido pantoténico (vitamina B5) apresenta ralação com o entupimento de branquias, opérculo distendido e atrofio das células acinares do pâncreas, foram registados também crescimento pobre dos peixes e mortalidade. O entupimento das brânquias nos peixes com défice de ácido

pantoténico é designado de hiperplasia das brânquias, onde a lamela destas cresce e funde, restringindo a respiração, os peixes são vistos a arfar especialmente quando estressados, e morrem com bocas escancaradas (Hardy, 2001). O Défice de piridoxina (vitamina B6) encontra-se maioritariamente relacionado com doenças e problemas nervosos, como natação errática, convulsões, espasmos entre outros sintomas. Os peixes afetados com défice de piridoxina parecem normais num minuto e no seguinte parecem paralisados, afundando na coluna de água, frequentemente com a cauda primeiro, movendo apenas as suas brânquias, parecendo congelados (Hardy, 2001). A biotina (vitamina B7 ou B8) é apontada como coadjuvante de sintomas e doenças como despigmentação da pele, hipersensibilidade, natação anormal, lamela das brânquias degenerativa, atrofia muscular, convulsão espática e ainda aumento do número de células mucosas dermaticas. A importância do ácido fólico (vitamina B9) é também mencionada, estando alguns sintomas associados à deficiência deste na dieta, como anemia, aumento de sensibilidade a infeções bacterianas e crescimento lento entre outros já mencionados anteriormente. A carência de vitamina B12 está associada ao crescimento pobre dos peixes maioritariamente. São apresentadas ainda causas relacionadas com o défice de colina e inositol nas dietas como o aparecimento da coloração branco-acinzentado no intestino característica em peixes, crescimento pobre, abdómen distendido, anemia e corrosão de barbatanas no caso do inositol e abdómen estendido, rim e intestino hemorrágicos, fígado gordo e mortalidade no caso da colina.

A identificação de deficiências vitamínicas nas dietas seria algo relativamente fácil se apenas uma das vitaminas estivesse em défice num dado momento, no entanto não é isso que muitas vezes acontece, sendo difícil aos produtores identificar a fonte do défice. Estão documentadas várias indicações que podem ajudar os produtores a identificar deficiências, como sendo a presença ou ausência de anemia que geralmente pode ser usada para distinguir entre deficiência de vitamina E e ácido ascórbico (Hardy, 2001). Ainda, evidências de coluna partida, escoliose ou lordose, opérculos encurtados, ou mandíbulas flexíveis podem ser usados para fazer um diagnóstico percussivo de deficiências de ácido ascórbico em vários peixes (Hardy, 2001).



Figura 10 - Salmão com escorbuto. Imagem representativa dos efeitos negativos provocados pelo déficit de vitamina C na dieta de peixes. Exemplos superior e inferior na imagem com escorbuto e peixe central normal. Peixes representados: Salmão (*Salmo salar* (Linnaeus, 1758) (Hardy, 2001)

Em condições aquáticas os animais estão muitas vezes sob estresse resultante do transporte, aglomeração, manipulação e deterioramento da qualidade da água (Koshio, 2007). É por isso importante procurar soluções práticas para reduzir a incidência e efeitos deste estresse imputado nos animais, já que o estresse pode colocar os peixes mais suscetíveis a doenças infecciosas, em parte pelo aumento da secreção de corticosteroides que suprimem o número de funções dos linfócitos circulantes (Tucker, 2012).

Condições de estresse estão relacionadas também com deficiências no crescimento, inibição de reprodução, comportamento anormal e imunodepressão, muitas vezes associados com doenças infecciosas e morte (Ortuño *et al.*, 2003). Num estudo publicado por Ortuño e seus colegas em 2003 na revista *Fish & Shellfish Immunology*, averiguou-se o efeito da suplementação na dieta das vitaminas C e E na resposta ao estresse de uma espécie de dourada, *Sparus aurata L.* sendo que após 6 semanas de suplementação existiam diferenças estatisticamente significativas na atividade oxidativa quando comparado o grupo suplementado com o de controlo. Este estudo sugere ainda que a vitamina C e E estejam envolvidas também com respostas terciárias a estresse como imunodepressões, onde elas protegem as funções dos leucócitos. A depleção de vitaminas induzida por estresse pode também reduzir a resistência a doenças, é por isso importante que sejam incluídas nas rações vitaminas suficientes (Tucker, 2012).

As culturas de peixe estão suscetíveis às mais variadas doenças, como doenças infecciosas, que são uma das causas de perda econômica em aquacultura comercial (Gatlin III, 2002). A suplementação adequada é tão ou mais importante quanto as condições de operacionalidade das culturas em si, como a manutenção da qualidade da água.

2.4. Minerais

Além das vitaminas, outro fator importante a ter em conta na formulação das dietas são os minerais, macro e microminerais. Os peixes ao contrário dos animais terrestres, conseguem absorver alguns minerais (elementos inorgânicos) não apenas pela sua dieta, mas também através do ambiente aquático externo, sendo difícil conseguir água livre de minerais para estudos das necessidades destes (N.R.C., 1993).

A deficiência de minerais na dieta recai sobre três categorias gerais: (1) aquelas que afetam a mineralização de tecidos duros; (2) aquelas que afetam outros tecidos específicos; e (3) aquelas que não afetam tecidos específicos (Hardy, 2001), sendo apresentadas as categorias abaixo na tabela 5.

Em culturas de peixe, a deficiência de fosforo é a única provável de afetar a mineralização de ossos e escamas (Hardy, 2001), este é obtido principalmente por ossos, quer por introdução e farinha de peixe, farinha de carne e osso entre outros.

Para espécies marinhas, a água fornece a maioria do cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg), cobalto (Co), potássio (K), sódio (Na) e zinco (Zn) (Nates 2016). Pelo contrário, fosfatos e sulfatos são mais efetivamente obtidos pela alimentação (N.R.C. 1993). Os peixes regulam a concentração de vários minerais por absorção e secreção destes, no entanto, alguns metais pesados como Pb, Cd, Cu ou Hg são mais dificilmente regulados e podem acumular-se no organismo, tornando-se eventualmente tóxicos (N.R.C., 1993; Lall, 2002).

Tabela 5 – Categoria dos minerais essenciais com base na função fisiológica. Tabela descritiva das funções fisiológicas de vários minerais importantes para a dieta de peixes em aquacultura, divididas por três categorias gerais: (1) Mineralização de osso/escama; (2) Função fisiológica específica; e (3) Função fisiológica geral. Fonte: Hardy, 2001.

<i>Categoria/Mineral</i>	Função
<i>(1) Mineralização de osso/escama</i>	
<i>Cálcio</i>	Osso, escama, pele, músculo
<i>Fósforo</i>	Osso, escama, pele, fosfolípidos
<i>Magnésio</i>	Osso, escama, pele, função muscular
<i>(2) Função fisiológica específica</i>	
<i>Ferro</i>	Hemoglobina
<i>Selênio</i>	Glutathione peroxidase
<i>Iodo</i>	Função da tireoide
<i>Sódio e Potássio</i>	Balço iônico
<i>(3) Função fisiológica geral</i>	
<i>Cobre</i>	Cofator para atividade enzimática
<i>Manganês</i>	Cofator para atividade enzimática
<i>Zinco</i>	Cofator para atividade enzimática

A suplementação de certos minerais a níveis acima das necessidades para o normal crescimento e abaixo de valores que causam toxicidade pode potencializar o funcionamento do sistema imunitário e resistência a doenças em peixes, no entanto esses efeitos não são sempre evidentes (Gatlin, 2007). Provavelmente por causa da facilidade com que o peixe pode absorver cobre a partir de água, não foi descrita a deficiência de cobre, por si só (Robert *et al.*, 2002).

É por isso necessário cautela na formulação, tendo em conta os níveis presentes nas reservas do organismo, concentração no ambiente e dieta, bem como a interação com outros componentes presentes como as vitaminas, já que efeitos antagônicos e sinérgicos foram já reportados na relação minerais/minerais e minerais/vitaminas (Oliva-Teles, 2012). Como por exemplo, Ca, P e fitato são inibidores bem conhecidos da disponibilidade de Zn (Satoch, 2007). E por isso as dietas que incluem níveis

elevados de ração de peixe (rica em Ca e P) ou fitato requerem níveis mais altos de Zn (Oliva-Teles, 2012).

Deficiências de cálcio e magnésio, o outro principal constituinte do osso, são relativamente difíceis de criar e pouco prováveis de acontecer (Hardy, 2001).

É descrito também por Oliva-Teles no seu artigo de revisão “Nutrition and health of aquaculture fish”, publicado em 2012, uma compilação de vários efeitos estudados por os mais variados autores no que toca a deficiência de certos minerais nas dietas de peixes em cultura, sendo descrito por exemplo que em truta arco-íris, a deficiência de Mn e Zn causou uma depressão da atividade dos leucócitos e que esta atividade poderia ser restaurada a níveis normais através da alimentação com níveis suficientes destes elementos.

O zinco é outro mineral que pode tornar-se deficiente nas dietas de peixes, principalmente por interações antagonísticas com outros ingredientes, como o fitato e altos níveis de cinzas (altos níveis de cálcio e fosforo) (Hardy, 2001), esta deficiência de zinco resulta também em cataratas bilateral das lentes, que é irreversível, sendo a deficiência de zinco a fonte mais provável de cataratas em aquacultura comercial (Hardy, 2001).

A deficiência de iodo causa hiperplasia da tiroide (bócio), no entanto esta deficiência é extremamente rara, mas fácil de detetar (Hardy, 2001).

Ainda a deficiência de cobre e selénio é pouco provável de causar efeitos agudos de deficiência ou mesmo perda de peixe (Hardy, 2001).

No entanto informação acerca dos benefícios de outros minerais é ainda escassa, havendo ainda também estudos que não encontrem qualquer efeito relacionado com a suplementação dos vários minerais, sendo ainda mais escassos os estudos com um painel mais alargado de minerais suplementados.

Capítulo 3

3. Desenho das formulações

Foi decidido desenhar as formulações com o objetivo de incorporação na ração de 1% na ração a administrar, sendo este um valor comum no mercado e por isso de mais fácil aplicação, tornando também possível uma mais fácil comparação de produtos durante o desenvolvimento deste, mas também aquando da comercialização.

Foi ainda solicitado pela empresa que fosse estudada a hipótese de poder usar concentrados vitamínicos (Cvit) já utilizados na empresa, na construção das formulações, sendo estes de mais fácil aquisição, aplicação e incorporação na mistura.

Foram fornecidos vários concentrados vitamínicos onde após deliberação foi escolhido o Cvit 5, sendo compatível o seu painel de constituintes com as formulações desenhadas e quantidades presentes, e por isso mais apropriado para integrar na formulação. Na tabela 6 é apresentada a lista de ingredientes presentes nesse concentrado, no entanto não podem ser apresentadas nesta monografia as quantidades presentes nos mesmos por uma questão de proteção do produto.

Tabela 6 – Composição de Concentrado Vitamínico 5. Lista de ingredientes que compõem o concentrado vitamínico e mineral escolhido. Vit. = Vitamina

Cálcio	Vitamina B12	D-Pantotenato de cálcio (Vit. B5)
Vitamina A	Vitamina B6	Ácido pantoténico (Vit. B5)
Vitamina D3	Vitamina B1	Ácido fólico (Vit. B9)
Vitamina E	Vitamina B2	
Vitamina K	Niacinamida (Vit.B3)	

O concentrado vitamínico Cvit 5 foi escolhido considerando também que a taxa de incorporação sugerida satisfaz os requisitos de compatibilidade. A referente taxa de incorporação permitiu desde logo estimar com clareza e rapidez os custos associados à sua inclusão na mistura, e sendo as quantidades presentes compatíveis com os pressupostos estabelecidos facilmente se encaixou este concentrado na formulação desenhada.

A sua taxa de incorporação é preferível neste caso já que irá minimizar os custos associados á produção, como sendo a pesagem dos vários ingredientes. Ao possuir a taxa de inclusão mais compatível de todos os concentrados, bem como quantidades aproximadas e mesmo ideais de alguns constituintes, permitirá que se reduzam as pesagem e carregamentos dos ingredientes no misturador, podendo estes fazer-se em menos passos, reduzindo o tempo total.

3.1. Excipientes

Muitos são, os excipientes usados nas formulações de pré-misturas, variando desde inorgânicos como carbonato de cálcio, sepiolite a orgânicos como farinhas de trigos, sêmola de trigo, . Os excipientes são substâncias que são capazes de absorver líquidos (por crivos ou poros) ou adsorver líquidos (aderindo a líquidos pela superfície de sólidos); uma substância que consegue aceitar e manter granulometria fina sem segregação ou separação no tempo (Ferket, 2015). Alguns dos excipientes com estas características são já usados na DIN, SA, o carbonato de cálcio e a sílica, sendo estes inorgânicos, e farinha de trigo, sendo este orgânico.

O tipo de excipiente usado num premix é dependente da funcionalidade, características físicas, tipo de ingrediente ativo, custo e disponibilidade (Ferket, 2015). Existem vários tipos de excipientes recomendados e comumente usados no fabrico de premix, sendo que estes se podem dividir ainda em orgânicos, como é o caso de farinha de casca de arroz, farinha de casca de amêndoa, farinha de carolo de milho, farelo de trigo e farinha de grãos de soja, e ainda inorgânicos, como carbonato de cálcio, fosfato dicálcio, propionato de cálcio, vermiculite e sílica (Flecket, 2015).

A escolha dos excipientes é um passo importante na construção da formulação, pensado na melhor performance do sistema de produção, objetivando obter uma mistura o mais homogénea possível, já que na prática, uma mistura perfeita não pode ser conseguida (Axe, 1995).

O conceito de uniformidade é intuitivo por si, sendo importante que os produtores se apercebam que se os ingredientes, particularmente micro-ingredientes como as vitaminas, aminoácidos, oligoelementos e fármacos, não forem incorporados corretamente, a performance animal será adversamente afetada (Axe, 1995). O ingrediente menor pode ser perdido antes da mistura começar (dispersando-se no ar) ou

durante a mistura (ao tornar-se carregado electrostaticamente e subindo para o topo do misturador) (Axe, 1995).

No entanto para facilitar o processo de inclusão, é necessário obter-se uma mistura o mais homogénea possível, tendo em conta os ingredientes usados. Para isso a escolha dos excipientes é da maior importância. Estes possuem características próprias com funções distintas, sendo que a vermiculite, sêmeas de trigo e farinha de carolo de milho possuem alta adsorção ao passo que a sílica e carbonato de cálcio possuem baixa adsorção estando as cascas de arroz entre estes com adsorção média (Flecket, 2015).

Uma propriedade comum a muitos compostos é a afinidade para humidade atmosférica, esta aquisição de humidade por um ingrediente pode resultar num número de alterações das propriedades físicas, como *caking* e entupimento, redução do número de partículas, aumento do tamanho de partícula e densidade (Axe, 1995). Isto pode impedir seriamente a capacidade de um ingrediente se espalhar uniformemente dentro de uma mistura. Características de baixa adsorção, quer a líquidos quer entre ingredientes, permitem uma mistura fluída, sem agregação no misturador que prejudique a incorporação. Além de que demasiada humidade num excipiente pode depois causar degradação de vitaminas por reações de oxidação-redução (Flecker, 2015). É por isso recomendado que os excipientes tenham humidade menor que 5%, alguns já possuem naturalmente estes níveis baixos de humidade como a casca de arroz e carbonato de cálcio (Flecker, 2015), no entanto outros poderão ter que ser sujeitos a processos de secagem anteriores à incorporação nas misturas.

As características gerais para o excipiente de premix ideal são um tamanho de partícula similar ao ingrediente ativo, baixa humidade (<5%) e não higroscópico, baixo teor de gordura (<4%), baixa propriedade electroestática e baixa adsorção adequada de ingredientes e adsorção de líquidos (Flecket, 2015).

Com base nas várias características e recomendações de uso para excipientes em premix vitamínicos, decidiu-se usar uma mistura de três excipientes, dois deles inorgânicos e o restante orgânico. Foi decidido usar o carbonato de cálcio e sepiolite (um silicato). Ambos são já usados pela empresa no fabrico de outras misturas, e tendo em conta as suas características de baixa adsorção e teor de humidade padrão de menos 5% e o facto de adição desta levar a uma mistura mais fluída, sendo indicada a sua aplicação aquando da adição de minerais traço a misturas. A sílica por ser recomendada

com a inclusão de vitamina A e cloreto de colina, por ter baixa adsorção e por não conter a par do carbonato de cálcio qualquer gordura, não fomentando estresse oxidativo na mistura, é também quimicamente inerte (Shah, 2004). Por último seria usado como excipiente orgânico a farinha de sêmola de trigo, sendo compatível no que toca às restantes vitaminas, e contendo um pH mais compatível que os restantes, sendo apenas ligeiramente ácido, mas próximo de neutro. No entanto este último excipiente acabou por ficar de fora já que se verificou que existia um perigo microbiológico associado á inclusão deste nas formulações, e por isso seria necessário um tratamento químico para reduzir o risco microbiológico. Este tratamento poderia ser feito com recurso a ácido fórmico, que poderia depois alterar as características organoléticas das rações e possivelmente torna-las menos apetecíveis pelas culturas, e ácido propiónico, que apesar de ser de mais fácil aplicação iria requerer um teste de estabilidade em câmara quente, tendo em conta o tempo de prateleira da mistura e registando as alterações no tempo, não havendo qualquer garantia da estabilidade microbiológica da mistura. Foi por isso decidido abandonar este excipiente nas formulações e incluir os restantes dois apenas num rácio de 50%-50%.

3.2. Aditivos

Além dos ingredientes já mencionados, vitaminas, minerais e excipientes, é necessário contabilizar a inclusão de aditivos, de maneira a conservar as características organoléticas do produto e minimizar a perda ou transformação de compostos deste no tempo, como são os conservantes.

Estes aditivos irão contribuir não só para a estabilidade da mistura em armazenamento depois da produção, mas também para minimizar os danos provocados por cozimento por extrusão que é aplicado às rações onde estas formulações serão adicionadas. Algumas vitaminas registam <75% da atividade vitamínica original após aplicação de processo de *pelleting* por extrusão e três meses de armazenamento (Gabaudon & Hardy, 2000), como apresentado na tabela 7.

A maior parte dos produtores de aquacultura assume que as vitaminas estão estáveis durante o armazenamento das dietas, mas muitas não estão. Sendo que alguns armazenam as dietas por mais de três meses, congelando mesmo, o que na verdade acelera a destruição de alguns nutrientes (Hardy, 2001).

O principal método de produção de dietas para aquacultura mudou deste há vários anos do mais tradicional pellet obtido por compressão para o cozimento por extrusão (Barrows & Hardy, 2001), mais utilizado atualmente. Este método, foi já documentado por vários autores como sendo um método de processamento agressivo causando destruição significativa de vitaminas em suplementos e ingredientes, e tem também uma variedade de efeitos na qualidade geral das rações (Barrows *et al.*, 2008).

Tabela 7 – Estabilidade das vitaminas. Tabela de atividade (%) restante das várias vitaminas, presentes em pellets a vapor e pellets por extrusão, após três meses de armazenamento a temperatura ambiente. Fonte: Gabaudon e Hardy, 2000.

Vitaminas	Pellets a Vapor (%)	Pellets por Extrusão (%)
Vitamina A	85-95	70-90
Vitamina D	90-100	75-100
Vitamina E	90-100	90-100
Vitamina K	70-90	40-70
Vitamina B1	85-100	60-80
Vitamina B2	90-100	90-100
Vitamina B6	90-100	80-90
Ácidos pantoténico	90-100	80-100
Niacina	90-100	90-100
Biotina	90-100	70-90
Ácido fólico	70-90	50-65
Vitamina B ₁₂	60-90	40-80
Inositol	100	100
Colina	100	100
Ácido ascórbico	30-70	10-30
Ascorbato-2-fosfato	90	90

A suscetibilidade para destruição por calor e pressão varia no entanto no leque das vitaminas, sendo que não existe uma só condição de processamento que possa ser

usada para minimizar perdas em todas as vitaminas, no entanto os tipo de condições de secagem e condições desta têm vindo a mudar ao longo dos anos existindo em paralelo um incentivo económico para que as industria processem de maneira mais rápida os seus produtos, isto pode levar a aumentos das temperaturas de secagem que podem reduzir a retenção de vitaminas em dietas obtidas por extrusão (Andreson & Sunderland, 2002).

Alguns compostos já presentes na formação atuam como conservadores das características e compostos presentes, como é o caso da vitamina C, um poderoso e conhecido antioxidante. Os próprios excipientes contribuem para este processo ao proporcionarem um equilíbrio de pH da mistura, bem como uma atividade da água reduzida. Além destes é comum a adição de etoxiquina (1,2-dihidro-6-ethoxi-2,2,4-trimetilquinolina) (EQ). A primeira menção do uso EQ em rações foi em 1957, quando Kyle tratou ração de arenque com este, a níveis de 100 a 800 mg/kg para combater o sobreaquecimento da ração. Após adição à ração torna-se mais difícil com o tempo recuperar EQ já que esta é consumida nas reações que ocorrem. A International Maritime Organization, insiste que 100 mg/kg de antioxidante sejam detetáveis nas rações antes dos envios (Koning, 2002), por isso os produtores têm que adicionar quantidades maiores durante a produção. A razão responsável pela sua popularidade no uso pela indústria de rações para peixe é primeiramente a sua surpreendente capacidade de prevenir oxidação dos ácidos gordos altamente insaturados em doses baixas e em segundo lugar a sua rápida e fácil distribuição devido à sua fluidez (Koning, 2002).

Existem outros análogos de EQ, no entanto apenas um deles consegue competir com este em termos de eficácia e custo, chamado 1,2dihidro-2,2,4trimetilquinolina (hidroquina) (Koning, 2002). Outro antioxidante, o hidroxitolueno butilado (BHT) já foi virtualmente erradicado da indústria de rações para peixe, já que apresenta cerca de metade da eficácia de EQ e é vendido a preço semelhante (Koning, 2002).

Foi adicionada por isso etoxiquina à formulação, sendo que os valores de adição serão dentro dos parâmetros das diretivas europeias de até 150 mg/kg de ração completa. Tendo em conta a possível adição de mais Etoxiquina pelas empresas de produções de ração, projetou-se o uso de 100 g/kg de premix, que depois de incorporação a 1% irá refletir 100 mg/kg de ração completa, estando dentro dos

parâmetros da diretiva e permitindo margem para adição suplementar pela empresa de ração que incorporar o premix nos seus produtos.

No que diz respeito à toxicidade da Etoxiquina, é aparente que os níveis presentes em rações completas (400-1000 mg/kg) são baixos o suficiente para assegurar que nenhuma, ou mínimas, quantidades deste são recuperados em músculo de salmão alimentado por rações (Koning, 2002), e por isso espera-se que esta relação se mantenha para as espécies em causa tendo em conta as quantidades mais baixas usadas.

3.3. Planos alimentares

Como requerido pela DIN, SA no âmbito do projeto, foi necessário também desenhar planos alimentares, depois de estudada a importância da incorporação de vitaminas e minerais nas formulações, para as respetivas espécies. Estes foram já desenhados tendo em conta a compilação de dados apresentada pela FAO, que tem em conta vários planos alimentares já distribuídos e aconselhados por produtores de rações, não sendo a intenção do projeto a estruturação de um plano alimentar “de novo”, mas apenas a construção de um plano a ser incluído na venda das pré-mistura que seguirá como aconselhamento para o consumidor, tendo em conta a espécie em questão.

Estes planos alimentares ainda que tendo um papel um pouco passivo, são importantes, já que estudos recentes mostram assim como evidências empíricas de aquaculturas comerciais que certos desvios da alimentação até à satisfação (*Ad-libidum*), numa base diária, podem influenciar significativamente a saúde e resistência a doenças dos peixes em cultura (Gatlin III, 2002).

Os planos alimentares foram construídos tendo em conta planos aconselhados já existentes e testados, não sendo intenção do projeto testar ou melhorar a sua aplicabilidade ou resultados produzidos, servindo apenas como guia para o aquicultor, à semelhança dos outros produtos atualmente comercializados internacionalmente. A indicação de plano alimentar não é da exclusiva responsabilidade das empresas produtoras de premix, uma vez que estas não possuem controlo na sua maioria sobre todos os outros fatores nutricionais presentes nas rações base nem das condições de operacionalidade das aquaculturas.

Para as várias espécies existentes são apresentados pela FAO planos alimentares que contemplam várias condições como temperatura de cultura, tamanho de pellet da

ração a aplicar e quantidade de alimento diário a aplicar por percentagem de peso do pescado. Tipicamente, as rações são formuladas por controlo do tamanho do pellet de maneira a acomodar várias espécies e fases de crescimento para as quais são pretendidas (Boyd, 2015), possibilitando assim aos produtores aplicarem as rações em várias culturas e em fases de desenvolvimento diferentes, controlando apenas taxa de alimentação diária não sendo necessário para estes comprar rações específicas quando estas apenas variariam no tamanho de pellet. Ainda permite que a alimentação seja mais eficaz, uma vez que poderão existir peixes com tamanhos diferentes e desenvolvimentos retardados ou acelerados na mesma condição de cultura, conseguindo-se alimentar de forma mais eficiente todos. É sugerido pela FAO, podendo ser observado na tabela 8 para a dourada, diferentes tamanhos de pellet de ração que vão sendo ajustados em tamanho crescente com o aumento do peso corporal das douradas em cultura.

Tabela 8 – Tabela ilustrativa de plano alimentar sugerido para Dourada. Adaptado da informação disponível online em FAO, nas tabelas 5 e 13 da página de informação relativa à dourada (*Sparus aurata*) (FAO, 2015). Compilado com informação de várias empresas de rações (Biomar, Le Gouessant, Skretting), sendo apresentadas três temperaturas de cultura (17°C, 19°C e 21°C) com os respetivos valores de percentagem de alimento a administrar do peso corporal (%/BW). mm=milímetros; g=gramas; BW=Body Weight (peso corporal)

Diâmetro de pellet (mm)	Peso (g)	17°C %/BW	19°C %/BW	21°C %/BW
0.5	0.3 – 0,8	Ad-libidum	Ad-libidum	Ad-libidum
0.8	0.5 – 1	Ad-libidum	Ad-libidum	Ad-libidum
1	1 – 3	3.87	5.28	6.26
1.5 – 1.8	2 – 7	3.05	4.16	4.92
2.2	7 – 30	2.20	3.00	3.56
3.2	25 – 50	2.03	2.77	3.28
4	50 – 150	1.17	1.60	1.89
5.5 – 6	150 – 400	0.95	1.29	1.53
6 – 8	400 – 800	0.7	0.95	1.12
8 – 9	800 – 1200	0.57	0.77	0.92
9 – 10	+1200	0.43	0.59	0.7

Como observado, os dados compilados sugerem, regra geral, a aplicação de ração diminuindo a %/BW com o aumentar do peso dos indivíduos das culturas, também é de referir que em temperaturas mais elevadas de cultura é aconselhada a aplicação de uma maior quantidade de ração quando comparado a temperaturas mais baixas de modo a satisfazer as necessidades metabólicas das culturas. Para cada espécie o tamanho de pellet recomendado varia com o peso, bem como a quantidade de alimento a administrar.

Para a construção dos planos alimentares, selecionamos a informação alvo tendo em conta o produto que estava a ser produzido, e por isso, uma vez que a introdução de pré-mistura e ração estão diretamente relacionadas na maior parte dos casos,

selecionou-se apenas a informação referente às fases de crescimento onde esta introdução de alimento seco por ração, ocorre, mas também se eliminou informação relativa a manutenção de reprodutores já que não está incluído esse pressuposto na ação do produto. Também se teve em conta os tamanhos de pellet, e compilou-se uma média de tamanhos de maneira a simplificar os tamanhos a usar, não apresentando os tamanhos na sua totalidade, compreendendo o mesmo tamanho de pellet uma gama maior de peso corporal onde administrar. Selecionaram-se ainda as temperaturas que faziam sentido tendo em conta o mercado pretendido.

Os premix serão vendidos pela DIN, SA, à semelhança de outras empresas do setor, e serão depois incorporados em rações por empresas terceiras que poderão seguir as indicações fornecidas no que toca a taxas de incorporação e plano alimentar ou podem ainda estabelecer novas diretivas para o consumidor final tendo em conta o produto que tencionam produzir e o objetivo deste na nutrição dos animais.

Alguns produtores, com licença para tal, adquirem por vezes também os premix diretamente às empresas produtoras pré-inclusão nas rações, suplementando as rações nas suas instalações, e mais uma vez aqui poderão seguir ou não as diretivas recomendadas para o uso e aplicação dos mesmos, agindo da maneira que pensam ser a mais indicada para o objetivo e condições das suas produções.

Os produtores normalmente seguem as tabelas de alimentação indicadas pelos produtores de ração, sendo que muitas vezes estas podem não estar adequadas às condições exatas das culturas em questão, surgindo de ano para ano novos estudos dos ritmos alimentares, frequência de alimentação e performance de crescimento ambas em águas doce e salina para várias espécies importantes economicamente, como as tratadas neste projeto. Tem surgido também estudos de ritmos alimentares em alevins das várias espécies, sendo importantes estes estudos para que se perceba melhor tabelar os ritmos alimentares para as diferentes espécies.

3.4. Construção das formulações finais

Foram fornecidos pela empresa, dados relativos às matérias-primas no que toca aos preços por quilo destas. Estes dados são importantes e essenciais pois é também através destes que são criadas as formulações finais, que devem cumprir os objetivos da

empresa no que toca a custos de produção desejados além de todos os pressupostos nutricionais objetivados.

A margem de custos de produção a atingir não foi estabelecida pois o objetivo da empresa não passava já por restringir a construção das formulações com estes dados, decidiu-se por isso construir as formulações tendo em conta os gastos necessários em matérias-primas apenas, usando como ponto de referência formulações atualmente no mercado.

Poderá numa fase mais avançada do projeto e já depois do final deste estágio vir a ser necessário alterar a composição da formulação ligeiramente, já que quando forem finalmente contabilizados todos os custos de produção bem como a estratégia de mercado a seguir, poderá ter que haver redução das quantidades de alguns compostos, podendo também verificar-se o contrário a haver margem positiva para melhorar e fortificar as formulações na sua composição, sempre mantendo as propriedades pretendidas.

Em culturas semi-intensivas e intensivas a alimentação artificial é a principal fonte de nutrientes, sendo que esta representa nessas culturas cerca de 50% do total dos custos variáveis e por isso o uso de alimentação um pouco menos onerosa, equilibrada nutricionalmente e boas práticas de alimentação são fundamentais para otimizar o lucro, que é o principal objetivo da aquacultura comercial (Lovell, 2002).

De maneira a conseguir obter um produto que possa vir a ser competitivo no mercado poderá ser necessário recorrer aos ajustes já mencionados, até tendo em conta os novos métodos de processamento atuais onde por exemplo, o cozimento de rações por extrusão que são mais abusivos para algumas vitaminas do que métodos usados anteriormente na indústria (Hardy, 2001).

É objetivo da DIN, SA a criação de um produto de qualidade e por isso não se irá descurar as necessidades nutricionais das espécies alvo no processo, mesmo que isso signifique a obtenção de um produto com um preço final um pouco mais elevado, desde que este se justifique pela qualidade na suplementação eficaz das espécies em cultura suprimindo todas as necessidades nutricionais de vitaminas e minerais e cumprindo todos os pressupostos desenhados para as formulações no que toca aos espectro de ação e eficácia nas culturas.

Não serão apresentadas neste documento as formulações finais conseguidas no decorrer deste projeto para efeitos de proteção de produto por parte da DIN, SA, sendo que será apresentada de seguida uma tabela (tabela 9) onde constará apenas a composição destas sem referência a quantidades ou outros dados protegidos.

Tabela 9 - Composição de premix de espécies alvo. Tabela representativa da composição geral dos premix construídos para pregado, dourada e robalo.

Composição Premix Espécies Alvo	
Cvit 5	Cloreto de Colina
Vitamina C	Zinco
Biotina	Manganês
Inositol	

A composição geral das formulações, como observado na tabela 9, é comum ao pregado, robalo e dourada, já que se escolheu usar o mesmo concentrado vitamínico nas 3 formulações e ainda que o espectro de vitamínicas e minerais a usar seria o mesmo. Ficando as diferenças nestas três formulações na realidade a dever-se às quantidades inseridas em cada.

Tabela 10 - Composição de premix para camarão marinho. Tabela representativa da composição geral do premix construído para camarão marinho.

Composição Premix Camarão Marinho	
Cvit 5	Cloreto de Colina
Vitamina C	Zinco
Biotina	Manganês
Inositol	Astaxantina

Como evidenciado na tabela 10, a composição geral do premix construído para camarão marinho é regra geral de idêntico espectro, concentrando-se a diferença deste também nas quantidades efetivas que o constituem mas por sua vez também, pela adição de astaxantina.

Por se ter conseguido produzir apenas uma formulação, apenas os dados publicados dessa serão apresentados e na tabela 11.

Tabela 11 - Tabela de formulação desenhado para pregado. Tabela descritiva da formulação desenhada para pregado. Dados divulgados apresentados também em etiqueta de produção (figura 16). Valores apresentados em mg/kg de ração completa expeto vitaminas A e D, apresentadas em UI/kg ração completa (tendo em conta a taxa de incorporação de 1%, ou seja, 10kg por tonelada de ração).

Nutrientes	Formulação Pregado mg/kg ração completa
Vitamina A	13.5 UI*
Vitamina C	70
Vitamina D	1.8 UI*
Vitamina E	0.09
Vitamina K	0.0036
Vitamina B1	0.405
Vitamina B2	0.0099
Niacina	0.045
Ácido pantoténico	0.034
Vitamina B6	0.0054
Biotina	0.2
Ácido fólico	0.0018
Vitamina B12	0.000054
Inositol	-Não apresentado-
Cloreto de colina	100
Zinco	10
Manganês	25

Capítulo 4

4. Produção, Controlo de qualidade e Resultados

4.1. Formulação a testar e linha de produção.

Após conclusão do desenho das formulações construídas e revisão pela equipa da DIN, SA, decidiu-se passar à produção de modo a poder testar se os parâmetros de homogeneidade, tempos de carga e mistura estariam em conformidade com o esperado, e se o processo de produção em si necessitaria ou não de alterações para a produção destas.

Por ter uma presença maior no mercado e ser uma espécie produzida em aquacultura portuguesa, decidiu-se testar a produção das formulações para pregado. A produção teste das formulações estava de início objetivada para um misturador em “Y” que a empresa detém nas suas instalações, representado na figura 11 e que permitiria o teste para quantidades menores, sendo adequado para misturas de até 75 kg. No entanto no decorrer do projeto decidiu-se passar já para a linha de produção usada para as misturas que seguem para mercado, num misturador de maior capacidade, como pode ser observado na figura 12, que por sua vez permite misturas mais eficazes e controladas, bem como cargas de ingredientes e transporte deste no processo sem maiores perdas de produto. Ainda permite um processo de ensaie representativo das condições reais, por ser usado pela a empresa para produção normal de pré-misturas, e amostragem.



Figura 11 - Representação de misturador em "Y". Imagem explicativa de misturador em "Y" semelhante ao presente nas instalações da empresa para produções de baixas quantidades, no caso até 75 kg.

A produção da formulação para pregado nesta linha de maior capacidade, que é a usada para os produtos já comercializados pela empresa, permite uma melhor representação dos parâmetros e condições mencionada em cima, possibilitando que se conheçam realmente os pontos críticos da produção e assim avaliar em condições reais o desempenho do processo de produção bem como se a formulação se encontra adequada para o protocolo de produção em vigor neste misturador, permitindo identificar com maior precisão se a formulação necessita ou não se ser otimizada para o processo em questão.



Figura 12 - Linha de produção número 2. Foto da linha de produção nº2, nas instalações da DIN, SA, usada para o fabrico da formulação teste de pregado.

Foi necessário projetar de início uma quantidade a ser produzida, pelo que em discussão com a equipa técnica da empresa se estabeleceu que seriam produzidos 250 kg deste premix de pregado já que o misturador usado pode fazer cargas mínimas de 250 kg mantendo uma mistura homogênea, que reflete uma quantidade de 10 sacos de 25 kg de premix produzidos, conseguindo assim uma produção teste com custos menos significativos mas mantendo-se todas as condições para que se possa proceder ao

controle de qualidade adequado e fiabilidade dos resultados obtidos. As dosagens dos ingredientes a adicionar são feitas manualmente em balanças calibradas à exceção dos excipientes que estão já carregados em silos nas instalações da empresa, como apresentado na figura 13, e que são carregados automaticamente para o misturador desde a cabine de comando da linha de produção.



Figura 13 - Silos de armazenagem de excipientes. Representação de três silos de armazenamento de excipientes presentes nas instalações da DIN, SA que permitem o carregamento automático e doseado destes para a linha de produção.

Os excipientes começam por ser carregados para o misturador, isto para que seja possível uma mistura eficaz do micro-ingredientes como são as vitaminas e minerais, já que se estes fossem carregados de início poderiam ficar alojados no final do misturador ou nas paredes deste, devido a sua baixa quantidade e características própria quando comparados aos excipientes, e aquando do início da mistura não ocorreria uma incorporação eficaz não se obtendo homogeneidade do produto.

Como mencionado anteriormente aquando da descrição dos excipientes e da sua função, o ingrediente menor adicionado pode ser perdido antes da mistura começar

(dispersando-se no ar) ou durante a mistura (ao tornar-se carregado electrostaticamente e subindo para o topo do misturador é por isso importante haver uma carga inicial de excipientes para evitar a perda de ingredientes menores como as vitaminas. As vitaminas e minerais são adicionados depois por processo manual, onde estes são pesadas manualmente, por se apresentarem em pó, e carregados numa entrada específica que faz o transporte direto para dentro do misturador.

4.2. Controlo de Qualidade

Após a carga dos excipientes e de seguida dos outros ingredientes que compõem a formulação deu-se início à mistura que ocorreu durante 10 minutos. O tempo de mistura usado foi o sugerido pela empresa, isto porque a empresa tem todos os misturados da sua linha de produção com tempos de mistura validados para os ingredientes usados, não sendo necessário efetuar uma nova validação para esta mistura, sendo que foi estabelecido que após produção se não se verificasse homogeneidade na mistura por alguma razão, aí sim, proceder-se-ia a nova calibração dos tempos de mistura com um estudo no tempo para encontrar o tempo ótimo de obtenção de mistura homogénea.

O calculo do coeficiente de variação de Pearson é usado para quantificar a homogeneidade de uma mistura, representado na figura 14, cujo resultado é normalmente uma percentagem e que segundo os critérios definidos no Manual de Boas Práticas Testes de Contaminação Cruzada e Homogeneidade no Fabrico de Alimentos Compostos para Animais (VER-1 ABR 2014; 04.08.2014 DGAV) deve ser inferior a 8% ($CV \leq 8\%$) para que ocorra homogeneidade adequada.

$$C_v = \frac{S}{m}$$

Figura 14 - Representação da fórmula de cálculo do coeficiente de variação de Pearson. Onde "CV" representa o coeficiente de variação, "S" o desvio padrão, e "m" a média aritmética. Poder-se-á ainda multiplicar por "100" o resultado, passando a expressar-se sob a forma de percentagem.

Para proceder aos testes de homogeneidade e por isso cálculo do coeficiente de variação foi necessário escolher um oligoelemento a analisar na mistura. Tendo em conta os testes rotineiros já efetuados para outras misturas comercializada, que têm protocolos já bem estabelecidos e afinados, foi escolhido o manganês para o cálculo do CV.

Foi necessário estabelecer um protocolo de amostragem correto e adequado e por isso procedeu-se à recolha de amostras aquando a ensacagem, apresentada na figura 15, como é recomendado por diretiva europeia e já praticado pela empresa. Esta amostragem fez-se nos 10 sacos obtidos, sendo que foram retiradas amostras em cinco pontos distintos e aleatórios de cada um dos 10 sacos, com recurso a uma sonda que permite a recolha de amostra em toda a profundidade do saco permitindo uma recolha eficaz e representativa de amostra. As amostras foram então enviadas para o laboratório da empresa que efetuou a análise das amostras encontrando-se dos resultados obtidos na figura 16.



Figura 15 - Processo de ensaque. Encontra-se representada a fase de ensacagem de produto, que corresponde ao final da linha de produção.

No processo de ensacagem o premix foi carregado em sacos de 25 kg já etiquetados, sendo a etiqueta apresentada na figura 16, que cumpriu com os pressupostos regulados para qualquer produto comercializado pela empresa. Neste são apresentadas informações como as quantidades de aditivos nutritivos presentes, vitaminas, pró-vitaminas e substâncias quimicamente bem definidas de efeito semelhante como é requerido pela legislação aplicável.



D.I.N. Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA
Zona Industrial da Catraia - 3441-909 SANTA COMBA DÃO
Telefone: 232 880 020 Fax: 232 880 021
E-mail: geral@din.pt www.din.pt



DIN PREGADO 1.0

PREMISTURA PARA PREGADOS 1%

Modo de Emprego: 1,0 % ou 10 kg / Tonelada de alimento completo.

3 - Aditivos Nutritivos / 3a - Vitaminas, Pró-vitaminas e Substâncias Quimicamente bem Definidas de Efeito Semelhante (Teor / kg)

Vitamina A (E 672)	13 500 UI
Vitamina D3 (E 671)	1 800 UI
Vitamina E / acetato de alfa-tocoferilo totalmente racémico (3a700)	90 mg
Vitamina K	3,6 mg
Vit. B1 - Tiamina Mononitrato	4,5 mg
Vitamina B2 - Riboflavina	9,9 mg
Ácido Pantoténico -D-Pantotenato de calcio	34 mg
Ácido Nicotínico	45 mg
Vitamina B6 / cloridrato de piridoxina (3a831)	5,4 mg
Ácido Fólico	1,8 mg
Vitamina B12 - Cianocobalamina	0,054 mg
Biotina	200 mg
Vitamina C - Ácido ascorbico (E 300)	70 000 mg
Colina - Cloreto de Colina	100 000 mg

3 - Aditivos Nutritivos / 3b - Compostos de Oligoelementos (Teor / kg)

Óxido manganoso (MnO)- Manganês (E5)	25 000 mg
Sulfato de zinco monohidratado - Zinco (E6)	10 000 mg

1 - Aditivos Tecnológicos / 1i - Antiaglomerantes (Teor / kg)

Sepilote (E 562)	300 000 mg
------------------	------------

1 - Aditivos Tecnológicos / 1b - Antioxidantes (Teor / kg)

Etóxiquina (E324)	6 660 mg
-------------------	----------

Excipiente: Carbonato de Calcio, Sepilote.

Armazenar em local seco e fresco.

Destinado exclusivamente ao fabrico de alimentos para animais.

Peso Líquido: 25 kg

Código: N01 1000

Data de Fabrico: 05-04-2016

Data de Durabilidade: 6 Meses Após a Data de Fabrico

NII: αPT3AA02498

Nº Lote: 0972

Figura 16 – Exemplo de etiqueta de produto para o caso do pregado. Representação da etiqueta de produção, tal como acompanharia o produto no mercado, mencionando todos os dados requeridos por lei.

Encontram-se também listados compostos de oligoelementos e aditivos tecnológicos como antiaglomerantes e antioxidantes. Nesta ficha segundo indicação das diretivas europeias encontram-se mencionados quais os excipientes usados sendo que só é necessário mencionar o carbonato de cálcio e não apresentar as quantidades presentes ao contrário da sepiolite.

Como indicado na etiqueta de fabrico, a data de produção da formulação foi a 5 de abril do presente ano de 2016, sendo que foram enviadas no mesmo dia para análise do oligoelemento Manganês para os laboratórios da empresa, tendo recebido os resultados destes a 20 do mesmo mês.

O teste de homogeneidade efetuado, e apresentado na figura 17 abaixo, compreendeu a amostragem dos 10 sacos obtidos com a produção teste de 250kg de premix, sendo que cada saco contem 25 kg de mistura aquando o ensaie. Os valores de manganês detetados com o teste de homogeneidade efetuado, pelo laboratório certificado da DIN, SA, compreende-se entre um mínimo de 21,344 g (Mn)/kg e um máximo de 24,703 g (Mn)/kg de mistura originando uma média de 22,721 g (Mn)/kg quando calculada usando todos os valores obtidos para os 10 sacos, obteve-se ainda um desvio padrão de 1246,4. Com estes dados calculou-se então o Coeficiente de Variação (CV) em percentagem que foi de 5,5%. Os critérios definidos no Manual de Boas Práticas Testes de Contaminação Cruzada e de Homogeneidade no Fabrico de Alimentos Composto para Animais (VER-1 ABR 2014; 04.08.2014 DGAV) refere que para se obter uma mistura eficaz, e por isso homogénea, esta deve corresponder a coeficiente de variação menor que 8%, pelo que poderá considerar-se que a produção teste foi um sucesso nestes termos, tendo se conseguindo á primeira mistura cumprir com estes pressupostos, sem necessidade de comprometer depois a formulação desenhada.

Entidade **D.I.N. Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA**

Amostra **N01 1000 DIN PREGADO 1.0**
Lote 0972
Data Fabrico 05.04.2016
Linha 2 / Projecto Desenvolvimento Produtos Aquacultura

1. Resultados Analíticos

Relatório de Ensaio	Ref.	Manganês (mg (Mn)/kg)
2016/4.203	Saco 1	22249
2016/4.204	Saco 2	22688
2016/4.205	Saco 3	21344
2016/4.206	Saco 4	21650
2016/4.207	Saco 5	21396
2016/4.208	Saco 6	21663
2016/4.209	Saco 7	23516
2016/4.210	Saco 8	24071
2016/4.211	Saco 9	23928
2016/4.212	Saco 10	24703

2 - Resultados - Cálculo do Coeficiente de Variação

Média = 22721
Desvio Padrão = 1246,4
Coeficiente de Variação (%) = 5,5

Conclusão: **HOMOGENEIDADE ADEQUADA (CV ≤ 8%) (*)**

(*) Critérios definidos no Manual de Boas Práticas *Testes de Contaminação Cruzada e de Homogeneidade no Fabrico de Alimentos Compostos para Animais* (VER-1 ABR 2014; 04.08.2014 DGAV)

Data: 20 Abril 2016

D.I.N. Desenvolvimento e Inovação Nutricional, SA
Laboratório de Investigação e Desenvolvimento
Zona Industrial da Catraia Apartado 50
3441 – 909 Santa Comba Dão
Telf.: 232 88 00 20 Fax: 232 88 00 21
e-mail: geral@din.pt
www.din.pt

Figura 17 - Resultado do teste de homogeneidade. Encontra-se exposto a ficha com o resultado para o teste de homogeneidade, sendo apresentados os valores obtidos de Manganês (mg(Mn)/kg) em cada um dos dez sacos, sendo também apresentado o resultado do cálculo do coeficiente de variação (%) = 5,5.

Capítulo 5

5. Discussão

No decorrer do projeto desenvolvido no âmbito do estágio curricular de Biotecnologia - Ramo Alimentar, na DIN, SA, desenvolveram-se quatro formulações de premix vitamínico bem como planos alimentares para quatro espécies propostas. As espécies propostas para trabalhar neste projeto, e escolhidas em conselho com a equipa técnica da DIN, SA, foram o pregado, robalo, dourada e camarão marinho.

As deficiências vitamínicas e minerais são reportadas como as mais fáceis de se evitar, no entanto esta são a categoria de deficiências mais observadas em aquacultura comercial (Hardy, 2001). Tendo em conta dos dados disponíveis sobre as necessidades nutricionais para cada espécie extrapolaram-se valores das quantidades a usar para os quais existisse um lacuna de informação relativa a suas necessidades tendo em conta também as perdas a registar no processamento, armazenamento e também aquando da inclusão em ração. Já que o processo de formulação de dietas e produção (por exemplo, trituração, aquecimento, adição de humidade, *pelleting* e secagem) adiciona um elemento de incerteza à estabilidade e biodisponibilidade de certos nutrientes essenciais, que muitas vezes resulta em deficiências clínicas de muitos nutrientes (Hardy, 2001), pois além de serem fatores que incutem uma condição de stress nas misturas, são ainda fatores que diferem entre produtores de ração, os quais vão incorporar as pré-misturas produzidas, e que não podem ser controlados, sendo incerto o nível de trituração, temperaturas usados ou humidade introduzida nos processos de produção.

Foram ainda criados também planos alimentares para cada espécie correspondente, indo servir estes de guia, como sugestão de aplicação a acompanhar os premix. Estes planos alimentares poderão servir de ferramenta quer par os produtores quer para as empresas de ração que escolham inserir os premix nos seus produtos.

Das formulações criadas, apenas a do pregado seguiu para produção teste, na linha de produção “2”, nas instalações da DIN, SA, onde esta cumpriu todos os pressupostos de produção estabelecidos, no entanto, uma vez que não se conseguiu iniciar a produção das restantes formulações ficou por apurar se estas se comportariam da mesma forma e se se obteria os mesmos resultados nos critérios estabelecidos.

Para esta produção teste seguiram-se todas as normas e diretivas europeias atuais, tendo sido por isso um sucesso no que toca à produção em si. Apenas a formulação do pregado seguiu para produção teste também porque o objetivo era perceber se a formulação conseguiria passar por todas as fases de produção respeitando os critérios em vigor e esperados, como os critérios de mistura homogénea, vindo-se a verificar com um CV = 5,5%, sendo que um CV < 8%, seria o ideal segundo o Manual de Boas Práticas Testes de Contaminação Cruzada e Homogeneidade no Fabrico de Alimentos Compostos para Animais (VER-1 ABR 2014; 04.08.2014 DGAV). Ficaram por isso dados os primeiros passos para que a DIN, SA desenvolva os seus primeiros produtos na área da aquacultura e assim se comece a estabelecer também neste mercado, tendo sido recolhida informação importante com a produção teste do premix de pregado para que se possa passar às seguintes formulações.

Ainda que estas formulações possam não vir a refletir na sua totalidade o produto final a comercializar pela DIN, SA, pensa-se que tenha sido cumprido o objetivo dos trabalhos propostos em estágio, que assentavam no desenho de formulações customizadas e nutricionalmente adequadas para cada uma das espécies bem como respetivos planos alimentares. Já que a natureza de competitividade de preços da aquacultura é agora também mais como as outras culturas requerendo um aumento na precisão das formulações de dietas de maneira a minimizar custos de produção mantendo a máxima performance (Barrows *et al.*, 2008). No entanto apesar das deficiências vitamínicas, em conjunto com as minerais, serem relativamente fáceis de evitar nas dietas reais dos peixes, estas são a categoria de deficiências mais observadas em aquacultura comercial (Hardy, 2001). Foi tido sempre em conta durante a criação das formulações todos estes pontos importantes que vão além das necessidades nutricionais, já que foram desenhadas com vista a suprimir a ocorrência de doenças, não só relacionadas com o défice nutricional na alimentação, mas também com um carácter ativo de prevenção de doença, fatores que foram já apontados e são suportados por variadíssimos autores, onde estas deficiências provocam por exemplo malformações no pescado e até uma aumento de mortalidade registada nas culturas (Hardy, 2001; Barrows *et al.*, 2008; Tucker, 2012).

A vitamina A desde cedo mostra que pode ser um aliado valioso ao diminuir a suscetibilidade de animais a uma variedade de infeções (Blazer, 1992). Já o défice

desta está relacionado com vários fatores, desde o impedimento do crescimento do opérculo, despigmentação da pele, deslocamento dos olhos, pele e barbatanas hemorrágicas entre outros (Koshio, 2007).

Efeitos semelhantes aos observados com adição de vitamina A e E são também evidentes com adição de vitamina C para valores de 3000 mg/kg e de 12000 mg/kg quando testado combinado com vitamina E (Koshio, 2007).

Ainda uma lista de sintomas e doenças associadas ao déficit de ácido ascórbico (vitamina C), como escoliose, anemia, lordose, hemorragias nas barbatanas e na derme, crescimento pobre, coloração escura da pele, e mortalidade (Hardy, 2001) sendo por isso uma das vitaminas que elevado peso teve nas formulações.

A deficiência de vitamina K é apontada como relacionada com as branquias e olhos hemorrágicos, coágulos de sangue prolongados e anemia (N.R.C 1993).

Ainda foi importante analisar as vitaminas do complexo B, e tê-las em conta na construção das formulações, analisando as quantidades necessárias a incluir para assim tentar mitigar as várias doenças associadas ao déficit destas como sendo: perda de equilíbrio, hiperirritabilidade, convulsões, hemorragias subcutâneas, distúrbios nervosos, incrementos de mortalidade, deformidades, fotossensibilidade, crescimento pobre, entupimento de branquias, opérculo distendido, atrofio das células acinares do pâncreas, natação errática, espasmos, despigmentação da pele, hipersensibilidade e anemia (Hardy, 2001).

Até ao final do projeto levado a cabo neste estágio não tinham ainda sido iniciados os testes descritos, uma vez que por estarem dependentes da candidatura conjunta a fundos comunitários, bem como a construção da candidatura em si e ainda os prazos estabelecidos para concurso terão que ser respeitados, pelo que esta fase final do projeto apenas irá continuar já após o final do estágio curricular atual.

Espera-se que estas formulações, aquando da sua entrada no mercado, venham a distinguir-se pela rentabilidade e eficiência que irão induzir nas culturas dos produtores, esperando poder vir a reduzir o uso de fármacos, caros e com custos de aplicação associados, esperando uma reflexão no aumento da otimização dos lucros para as produções que usem diretamente estes premix, ou rações onde esta esteja incorporada, e consequentemente para a empresa produtora dos premix e acolhedora do estágio em questão, a DIN, SA.

Capítulo 6

6. Conclusão

A aquacultura apresenta-se cada vez mais como uma forma predominante de obtenção de proteína animal pela população, e por isso, o trabalho desenvolvido no âmbito deste projeto é de especial importância, já que a boa ou má formulação de pré-misturas tem um impacto direto nas produções deste bem essencial. Espera-se então que os resultados obtidos e formulações criadas venham a originar produtos de valor acrescentado proporcionando aos produtores uma ferramenta essencial no potenciamento das suas culturas contribuindo para o crescimento e bem-estar destas, com condições de viabilidade comercial pioneiros em Portugal, enriquecendo o setor quer na oferta que na qualidade de produtos disponíveis, podendo vir a introduzir-se em mercados internacionais. Espera-se ainda que estes efeitos possam vir a ser comprovados com os testes *in vivo* das formulações vindo a enriquecer o produto estabelecendo-o no mercado como um de qualidade e efeitos comprovados.

Todo o processo de formulação foi pensado durante este estágio na DIN, SA e foi também testada a sua produção, tendo adquirido experiência laboral na área da nutrição animal e dos mecanismos que fazem mexer tão bem uma empresa bem estabelecida como a DIN, SA, no entanto é necessário percorrer ainda uma jornada longa e trabalhosa com testes *in vivo* e otimizações até á entrada destes produtos no mercado.

Capítulo 7

7. Trabalhos futuros

Além de todo o trabalho desenvolvido na DIN, SA, surgiu a necessidade no decorrer do projeto de iniciar um contato com a Escola Superior de Tecnologia do Mar (ESTM) em Peniche, pertencente ao Instituto Politécnico de Leiria (IPL), para que fosse estudada a hipótese de se vir a testar nas suas instalações, com recurso ao seu corpo técnico, as formulações produzidas. Estes testes teriam como objetivo a validação dos potenciais efeitos positivos da adição de uma pré-mistura vitamínica e mineral especialmente desenhada e pensada para cada espécie, suprimindo as necessidades nutricionais das culturas.

Ao longo dos anos, os produtores de ração animal procuram a otimização das suas rações para reduzir custos, melhorar a produtividade e eficiência ou para se ajustarem melhor as necessidades do mercado e à procura e preocupações do consumidor (Bureau, 2011).

Todos os anos são publicados estudos sobre as necessidades nutricionais de animais aquáticos e a composição e valor nutritivo de diferentes ingredientes da alimentação, no entanto, segundo esforços dos últimos anos pelo Fish Nutrition Research Laboratory têm indicado que, em geral, menos de 50% dos estudos publicados contêm desenhos experimentais apropriados, informação suficiente ou resultados suficientemente representativos e credíveis mas serem usados em meta-análises estatísticas (Bureau, 2011). É por isso da maior importância levar a cabo estes estudos *in vivo* de modo a validar toda a formulação desenhada e seus efeitos benéficos, e também que estes testes sejam desenvolvidos e desenhados por uma equipa multidisciplinar e capaz como é a equipa da ESTM.

Seriam avaliados fatores como mortalidade, ocorrência de doenças, crescimento e desenvolvimento das culturas.

O contato foi bem recebido pela professora Dr.^a Ana Violante Pombo, coordenadora de mestrado de Aquacultura na instituição, e após reunião em Peniche entre a DIN, SA. e a ESTM, foi decidido que se iria avançar com o teste das formulações no âmbito de uma candidatura conjunta a fundos comunitários.

Os ensaios a efetuar serão todos eles *in vivo* com as espécies alvo escolhidas, pregado, robalo, dourada e camarão marinho que irão compreender as fases mais importantes de desenvolvimento das culturas, estas serão as fases a partir das quais os aquicultores adquirem os animais para depois proceder a todo o processo de crescimento e engorda nas suas instalações. Nestas fases a alimentação compreende já a introdução de ração seca, pelo que é também uma fase ideal para se testar a introdução do premix e seus efeitos.

Irá numa fase posterior delinear-se os ensaios em conselho com a equipa técnica da ESTM que levará a cargo os ensaios no futuro. É essencial que o foco e objetivos destes testes reflitam as perspetivas dos produtores de rações e produtores de aquacultura. Idealmente estes devem focar-se de início na geração de informação necessária para adereçar questões chave económicas e de produção (crescimento, eficiência de alimentação, resistência a doenças, qualidade de produto, etc.) (Bureau, 2011).

Será necessário o fornecimento de uma ração base para que se desenvolvam os testes, sendo que se irá possivelmente testar os efeitos num grupo alimentado com a ração base e a pré-mistura desenvolvida contra outro grupo alimentado apenas com a ração sem inclusão da pré-mistura na dieta. Assim espera-se conseguir averiguar a eficácia da adição da pré-mistura desenvolvida nos vários parâmetros a monitorizar, podendo vir a recolher-se dados importantes que poderão vir a servir como distinção de qualidade e confiança à mistura, futuramente no mercado, para os produtores e empresas de ração que procurarem adquirir a pré-mistura para incorporação nos seus produtos.

Referências

- Allison, E.H. (2011) Aquaculture, fisheries, poverty and food security. *The WorldFish Center*, Penang, Malaysia ,60pp. (Working Paper,2011-65), in <https://goo.gl/6idN8u>. Consulted in February 15th of 2016.
- Anderson, J. S., & Sunderland, R. (2002). Effect of extruder moisture and dryer processing temperature on vitamin C and E and astaxanthin stability. *Aquaculture*, 207(1), 137-149.
- Ashley, P. J. (2007). *Fish welfare: current issues in aquaculture*. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3), 199-235.
- Axe, D. E. (1995). Factors affecting uniformity of a mix. *Animal feed science and technology*, 53(2), 211-220.
- Barrows, F. T., & Hardy, R. W. (2001). Nutrition and feeding. *Fish hatchery management, second edition*. *American Fisheries Society*, Bethesda, Maryland,483.
- Barrows, F. T., Gaylord, T. G., Sealey, W. M., Porter, L., & Smith, C. E. (2008). The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 283(1), 148-155.
- Béné, C., Barange, M., Subasinghe, R., Pinstrip-Andersen, P., Merino, G., Hemre, G. I., & Williams, M. (2015). Feeding 9 billion by 2050—Putting fish back on the menu. *Food Security*, 7(2), 261-274.
- Blazer, V. S. (1992). Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 309-323.
- Boyd, C. E. (2015). Overview of aquaculture feeds: global impacts of ingredient use. In: Feed and Feeding Practices. (ed. By Davis D.A.), pp 11– 25. *Woodhead Publishing*, Cambridge, UK
- Bureau, D. P. (2011) Better Defining Nutritional Requirements of Fish and the Nutritive Value of Feed Ingredients: Lessons from Integration of Experimental Data from a Wide Variety of Sources.
- de Koning, A. J. (2002). The antioxidant ethoxyquin and its analogues: a review. *International Journal of Food Properties*, 5(2), 451-461.
- FAO, Fisheries Aquaculture Department. (2016). Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. pp. 129-135. NACA, Bangkok and FAO, Rome. Available in: <https://goo.gl/D6hkFh>
- FAO, Fisheries Aquaculture Department. (2012) The State of World Fisheries and Aquaculture, Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO, Fisheries Aquaculture Department. (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO, Fisheries Aquaculture Department. (2015). Available in: <https://goo.gl/6fdC8c>. Consulted in October 23th of 2015.
- Flecker P. R. (2015) Micro-ingredient Premixing Available in: <https://goo.gl/CwhWCf>. Consulted in October 22th 2015
- Gabaudon, J. and R.W. Hardy. (2000). Vitamin Sources for Fish Feeds, In R.R. Stickney (Ed.), *Encyclopedia of Aquaculture*, 961-964. New York: John Wiley & Sons
- Gatlin III, D. M. (2002). Nutrition and fish health. *Fish nutrition*, 3, 671-702.

- Gatlin III, D. M. (2007). Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. *Cabi*. Higashihiroshima, Japan.
- Gerland, P., Raftery, A. E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., ... & Bay, G. (2014). World population stabilization unlikely this century. *Science*, 346 (6206), 234-237.
- Halver, J. E. (2002). The vitamins. *Fish nutrition*, 3, 61-141.
- Hardy, R. W. (2001). Nutritional deficiencies in commercial aquaculture: likelihood, onset, and identification. *Nutrition and Fish Health*, 131-147.
- INE, I.P. (2015). *Estatísticas de Pesca 2014*. Lisbon: Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- Josueit, H. (October 26–27, 2004). An overview on the world shrimp market. Presentation given at World Shrimp Markets 2004. Madrid, Spain: FAO GlobeFish.
- Koshio S. (2007) Vitamins. In: Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish (ed. By H. Nakagawa, M. Sato & D.M. Gatlin), pp. 35–46. *CAB International*, Oxon, UK.
- Kyte, R. M. (1957). Bulk handling of Alaska herring meal. *Com. Fisheries Rev*, 13(5), 9-14.
- Lall, S. P. (2002). The minerals. *Fish nutrition*, 3, 259-308.
- Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., & Klesius, P. H. (2008). Nutrition and disease resistance in fish. Feeding and digestive functions of fishes. *Science Publishers, Inc*, Enfield, NH, 479-545.
- Lovell, R. T. (2002). Diet and fish husbandry. *Fish Nutrition, Third edition*. Academic Press, San Diego CA, 703-754.
- Lovell, R. T., & Lim, C. (1978). Vitamin C in pond diets for channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 107(2), 321-325.
- Nates S.F. (2016) *Aquafeed Formulation*. Academic Press.
- National Research Council (US). Committee on Animal Nutrition. (1993). *Nutrient requirements of fish*. Course Technology.
- Oliva Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*, 35(2), 83-108.
- Ortuño, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*, 14(2), 145-156.
- Ottinger, M., Clauss, K., & Kuenzer, C. (2016). Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments—A review. *Ocean & Coastal Management*, 119, 244-266.
- Phromkhuntong, W., Supamattaya, K., & Jittione, W. (1987). Effect of water soluble vitamins on growth, body composition and histology of seabass. In *Report of the Aquatic Science Division* (p. 37). Faculty of Natural Resources, Prince of Songkhla University Thailand.
- Pimoljinda, T., & Boonyaratpalin, M. (1988). Study on vitamins requirement of sea bass: *Lates calcarifer* in sea water. In [Seminar on Fisheries 1988], Bangkok (Thailand), 21-23 Sep 1988. Roberts, R. J., & Bullock, A. M. (2002). Nutritional pathology. *Fish nutrition*, 453-504.
- Satoh, S., Nakagawa, H., Sato, M., & Gatlin III, D. M. (2007). Minerals. *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*, 74-85.
- Shah, K. (2004). What is Silica? *EBS 425—Mineral Perindustrian*, 1.
- Shepherd, C. J., & Jackson, A. J. (2013). Global fishmeal and fish oil supply: inputs, outputs and markets. *Journal of fish biology*, 83(4), 1046-1066.

- Toufique, K. A., & Belton, B. (2014). Is aquaculture pro-poor? Empirical evidence of impacts on fish consumption in Bangladesh. *World Development*, 64, 609-620.
- Tucker Jr, J. W. (2012). Marine fish culture. *Springer Science & Business Media*.
- Webster, C. D., & Lim, C. (Eds.). (2002). *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*. Cabi